



Naturalis

Repositorio Institucional

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Análisis ecotoxicológico de una comunidad de anuros de la Región Pampeana : Efecto del Cr[VI] sobre embriones y larvas de distintas especies de una taxocomunidad

Natale, Guillermo Sebastián

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Ronco, Alicia Estela

Co-dirección: Basso, Néstor Guillermo

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

2006

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20120126000055>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP

ANALISIS ECOTOXICOLOGICO DE UNA COMUNIDAD DE ANUROS DE LA REGION PAMPEANA

Autor: *Lic. GUILLERMO SEBASTIAN NATALE*

Directora: *Dra. ALICIA ESTELA RONCO*

Co-Director: *Dr. NESTOR GUILLERMO BASSO*

Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad de La Plata

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones del Medio Ambiente, CIMA,
Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad
Nacional de La Plata

2006

a mis padres,

*y a aquellos que ríen con todo el cuerpo
y no intentan contener la risa*

Agradecimientos:

Al CONICET por sus becas.

Al CIMA y a todos sus integrantes, por brindarme un lugar de trabajo

A mis Directores, por guiarme.

A mi Familia por bancarme tanto.

A Rubén Cobeñas y Sergio Molfesa por permitirme trabajar en el establecimiento Santa Ana.

Y particularmente a los que generaron, compartieron y/o respondieron mis inquietudes del primero al último: Carlos Natale, Jorge Williams, Fernando Archuby, Gustavo Bulus, Arturo Kher, Román Segovia, Alicia Ronco, Néstor Basso, Manuel Negrin, Rodrigo Altamirano, Leandro Alcalde, German Cheli, Mariano Codesido, Leticia Peluso, Dario Podesta, Sebastián Cirignoli, Mariela Theiller, Maria Laura Martín, Cecilia Sobrero, Patrick Gado, Evaristo Perez, Valeria Tejedor, Raúl Herrera, Sergio Rosset, Marta Dure, Florencia Vera Candiotti, Alejandro Richeri, Rodrigo Cajade, Juan Carlos Autino, Federico Kacolis, Igor Bercunsky, Luciano Segura, Jorge Casciotta, , Jorge Merigi, Julián Faivovich, Maria Luz Arrellano, Gustavo Scillato Yané, Rafael Lajmanovich, Luciana Amassari, Gabriela Agostini, Esteban Lavilla , Diego Barrasso, Pablo Grilli, Alfredo Salibián, Pedro Carriquiriborde, Lucrecia Ferrari, Valeria Taborda, Maria Emilia Diaz Seijas, Eduardo Shaefer, Diego Baldo, Paola Peltzer, Luis Castro, Ignacio Roesler, Pablo Pessacq, Noelia Ferrando, Emiliano Bálsamo, Cristian Larsen, Damián Voglino y a Mónica Mainer.

INDICE

ANALISIS ECOTOXICOLOGICO DE UNA COMUNIDAD DE ANUROS DE LA REGION PAMPEANA

Página

RESUMEN	viii
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	
Marco teórico	1
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Antecedentes de la investigación	1
1.1.a Campo general de la investigación	1
1.1.b Contaminación por metales	2
1.1.c Contaminación por cromo y efectos asociados	2
1.1.d Los bioensayos como herramienta para detectar la contaminación	5
1.1.e ¿Qué especies utilizar a la hora de hacer ensayos?	7
1.1.f El estudio de los vertebrados en ecotoxicología	9
1.1.g Los anfibios anuros en el contexto de la investigación	9
1.1.h Las larvas de anuros como sistema de estudio	10
1.1.i Estudio de los efectos del cromo sobre anfibios	14
1.1.j Aportes a la justificación del problema de la disminución numérica de poblaciones de anfibios en el mundo	15
1.2. Problema de investigación e hipótesis	17
1.3. Justificación de la investigación	19
1.4. Esquema de la tesis	20

CAPÍTULO II

Planteo de hipótesis y objetivos	22
1 INTRODUCCIÓN	22
2 LISTADO DE PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	22
ECOTOXICOLOGÍA	22
GENÉTICA, FILOGENIA, TOXICOLOGÍA	23
ECOLOGÍA, TOXICOLOGÍA	24
TOXICOLOGÍA	24
BIOLOGÍA, ECOLOGÍA	25
3 HIPÓTESIS AUXILIARES	26
4 SUPUESTOS ASUMIDOS PARA LA INVESTIGACIÓN	27
5 HIPÓTESIS A CONTRASTAR Y PREDICCIONES (HIPÓTESIS DE TRABAJO)	27
6 OBJETIVOS GENERALES	29
7 LIMITACIONES Y ALCANCES	30

CAPÍTULO III

El ecosistema	31
1 EL AREA DE ESTUDIO	31
1.1. Introducción	31
1.2 Metodología	34
1.3 Resultados	35
2 EL CLIMA	37
2.1 Introducción	37
2.2 Metodología	37

	<i>Página</i>
2.2.a Caracterización del área de estudio (registros históricos)	37
2.2.b Caracterización climática del período estudiado (1998-2004)	39
2.3 Resultados	40
2.3.a Descripción de las variaciones estacionales típicas	40
2.3.b Descripción de fenómenos climáticos inusuales	49
2.4 Conclusiones	51
3 LOS SITIOS REPRODUCTIVOS	51
3.1 Introducción	51
3.2 Descripción de las características morfológicas	52
3.3 Descripción florística de las charcas y sus alrededores	55
3.4 Descripción faunística de las charcas y zona de estudio	56
3.5 Caracterización fisicoquímica del agua	61
3.5.a Introducción	61
3.5.b Metodología	62
3.5.c Resultados y conclusiones	64
4 BIOLOGÍA DE LAS ESPECIES DE ANUROS ESTUDIADAS	65
4.1 Estudios en campo	66
4.1.a Introducción	66
4.1.b Metodología	66
4.1.c Resultados de los estudios a campo	68
4.2 Estudios en laboratorio	68
4.2.a Introducción	68
4.2.b Metodología	70

	<i>Página</i>
4.2.b ₁ Obtención de huevos	70
4.2.b ₂ Ciclos en laboratorio	71
4.2.b ₃ Estudios bioecológicos	72
4.2.c Resultados	74
4.2.c ₁ Obtención de huevos	74
4.2.c ₂ Ciclos en laboratorio	75
4.2.c ₃ Estudios bioecológicos	75
4.3 Resultados, interpretación y conclusiones sobre la biología de las especies estudiadas	77

CAPÍTULO IV

Estudio detallado de la respuesta de una especie al Cr(VI)	123
1 INTRODUCCIÓN	123
1.1 Importancia de los bioensayos como herramienta bioanalítica	123
1.2 Consideraciones acerca de los bioensayos adudos de toxicidad	124
1.3 La necesidad de generar protocolos con especies autóctonas	124
1.4 El estudio de sensibilidad en las ranas	126
1.5 La variabilidad de la herramienta analítica empleada	127
1.5.a Variación no explicada	128
1.5.b Variación explicada	128
1.6 Algunas consideraciones sobre los factores modificadores de la toxicidad	129
1.7 Conclusión	131
1.8 Hipótesis y objetivos	132
1.8.a Hipótesis de la tesis que involucran este capítulo	132

1.8.b Hipótesis específicas de este capítulo	133
	<i>Página</i>
1.8.c Objetivos específicos de este capítulo	134
1.8.d Supuestos específicos de este capítulo acerca de la metodología de ensayo propuesta	135
2 METODOLOGÍA	136
2.1 Bioensayos de toxicidad	137
2.1.a Fuente de organismos	137
2.1.b Selección de organismos de ensayo	140
2.1.c Diseño experimental	140
2.1.c ₁ Determinación de las condiciones de laboratorio	140
2.1.c ₂ Diseño experimental general de los ensayos agudos	146
2.1.c ₃ Diseño experimental general de los ensayos crónicos	148
2.1.d Criterios de aceptación de los experimentos	149
2.1.e Variaciones del diseño experimental en los bioensayos de toxicidad del agua	151
2.2 Análisis de datos	160
2.2.a Resumen	161
2.2.b Consideraciones sobre el tratamiento de los datos y análisis estadístico	162
2.2.b ₁ Introducción	162
2.2.b ₂ Metodología	166
3 RESULTADOS Y CONCLUSIONES	179

CAPÍTULO V

Evaluación de la sensibilidad de las distintas especies estudiadas mediante bioensayos de toxicidad aguda, utilizando Cr(VI) como tóxico patrón de referencia	211
1 INTRODUCCIÓN	211
1.2 Efectos del cromo	212

1.2.a Efectos sobre animales	212
1.2.b Efectos y distribución en el ambiente	215

	<i>Página</i>
1.4 Hipótesis y objetivos	223
1.4.a Hipótesis de la tesis que involucran este capítulo	223
1.4.b Hipótesis específicas de este capítulo	223
1.4.c Objetivos específicos de este capítulo	224
1.4.d Supuestos específicos del Capítulo IV acerca de la metodología de ensayo propuesta	225
2 METODOLOGÍA	225
2.1 Bioensayos de toxicidad	226
2.1.a Diseño experimental propuesto	226
2.1.b Variaciones del diseño experimental	228
2.2 Análisis de datos	230
2.2.a Tratamiento de datos	230
2.2.b Análisis de datos	231
3 RESULTADOS	234
 CAPÍTULO VI	
Discusión y conclusiones	258
1 CONSIDERACIONES SOBRE LA BIOLOGÍA DE LOS ORGANISMOS Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN ESTUDIOS DE LABORATORIO	258
2 CONSIDERACIONES SOBRE LA ESPECIE ELEGIDA (<i>Hypsiboas pulchellus</i>) COMO MODELO DE ESTUDIO PARA EL DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA BIOANALÍTICA	259
3 CONSIDERACIONES SOBRE LA SENSIBILIDAD DE <i>H. pulchellus</i> AL CROMO DURANTE EL CICLO DE VIDA LARVAL	262
4 ALGUNAS CONSIDERACIONES DESDE EL PUNTO DE VISTA DE LA ECOLOGÍA LARVAL	268

5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS ECOTOXICOLÓGICOS	269
	<i>Página</i>
	<i>a</i>
6 CONSIDERACIONES SOBRE EL ESTUDIO ECOTÓXICOLÓGICO DE UNA TAXOCOMUNIDAD DE ANUROS	271
7 CONCLUSIONES	274
BIBLIOGRAFÍA	277

RESUMEN

La actividad humana produce gran cantidad y variedad de desechos tóxicos que son volcados de diferentes modos a los compartimentos de los ecosistemas. En general, los sistemas naturales poseen una determinada capacidad para soportar alteraciones debidas a la presencia de agentes xenobióticos mediante procesos internos de depuración. El deterioro de un ecosistema se produce cuando la cantidad de desechos introducidos superan su capacidad de recuperación. Lamentablemente, en la actualidad y durante las dos últimas décadas, los flujos de contaminantes han aumentado y se han superado ampliamente los umbrales establecidos, sin evaluar sus efectos potenciales, llegando en casos extremos a producir daños irreparables.

En lo que concierne a contaminantes ambientales, son de importancia los metales pesados, debido a que se les asocia una elevada toxicidad, incluso a muy bajas concentraciones. El hombre genera una continua introducción de metales en los ecosistemas acuáticos, los que superan frecuentemente los niveles umbrales de depuración de estos sistemas naturales. En el caso particular del cromo, la presencia de cromo hexavalente en los ambientes acuáticos está estrechamente relacionada con fuentes antrópicas: oxidación industrial de minas y depósitos de cromo, combustión de combustibles fósiles, madera, papel, aleaciones, catálisis, pigmentos, preservación de la madera e industrias del acero, vidrio, cemento y tanino.

En el presente trabajo de tesis se seleccionó al cromo hexavalente, obtenido por disolución de dicromato de potasio en agua de ensayo, como tóxico referencia. Si bien el cromo hexavalente no es un contaminante que constituya un problema para la sociedad actual, debido a sus propiedades fisicoquímicas y su distribución en el ambiente, presenta efectos sobre los ecosistemas acuáticos y la salud humana. Respecto a su manejo en laboratorio, el cromo hexavalente obtenido a partir de dicromato de potasio en solución acuosa, presenta ventajas para realizar bioensayos, debido a que es un patrón primario.

El modelo de investigación propuesto plantea un sistema de estudio en el cual se analizará de manera general el impacto que las actividades humanas tienen sobre la biosfera. Esta relación causa-efecto se mantiene, disminuyéndose la escala del sistema hacia un subsistema de estudio, abordable y mensurable. Este subsistema posee dos integrantes: por un lado, la contaminación química de origen antrópico que se introduce como un factor de impacto en los sistemas naturales, siendo el cromo hexavalente el componente representativo; por otro lado, las larvas de las distintas especies de anuros que habitan las charcas seleccionadas, como representantes del componente de la biota, uno de los compartimentos del ecosistema acuático seleccionado, el que formaría parte de un sistema mayor, la biosfera o la naturaleza.

Los anfibios anuros son los vertebrados más avanzados que conservan larvas de vida libre. La existencia de un ciclo de vida bifásico (con larvas acuáticas que sufren metamorfosis para originar un organismo terrestre), sumado a que sus huevos no tienen cáscara, genera en muchos casos una ontogenia

expuesta que facilita el análisis de su desarrollo en comparación con otros grupos de tetrápodos. Siendo vertebrados ectotérmicos, la actividad de los anuros está estrechamente relacionada con las variables físicas de los ambientes acuático y terrestre. Su piel es un órgano complejo que constituye la ruta principal de intercambio de gases para la respiración, agua e iones; quedando particularmente expuestos a la acción de tóxicos. No emigran del sitio en el cual eclosionan (completando su ciclo de vida en ese mismo lugar), lo cual los hace excelentes indicadores y registros de las condiciones locales. Poseen una gran diversidad morfológica y están presentes en la mayor parte de los ecosistemas, abarcando también una gran cantidad de hábitats. Por estas razones los anfibios anuros han sido propuestos en muchos casos como organismos centinelas o indicadores de impacto ambiental y riesgo ecológico.

El sistema de estudio seleccionado fue un campo de aproximadamente 300 hectáreas, situado en la planicie de inundación del arroyo El Pescado, a mitad de su recorrido (35°01'08"S; 57°51'28"O). Dentro del mismo se seleccionaron dos charcas temporarias, utilizadas como sitios reproductivos por las diferentes especies de anuros presentes en el lugar. De cada una de ellas se realizó una descripción morfológica, florística y faunística (listados de especies de las distintas poblaciones de vertebrados que frecuentan o habitan estos limnotopos) y una caracterización fisicoquímica del agua.

Particularmente se realizaron 248 muestreos entre enero de 1998 y diciembre de 2004 como parte de un monitoreo de larvas y adultos de las distintas poblaciones de anuros que habitaban el área de estudio. Complementariamente se efectuaron estudios de laboratorio a partir de los cuales se generó información básica sobre la biología de 16 especies de anuros autóctonos, describiendo aspectos básicos de su biología reproductiva, desarrollo en su fase de vida acuática, aspectos de su mantenimiento en cautiverio, condiciones de cría, y el efecto que ejercen diferentes factores modificantes sobre la tasa de crecimiento, tasa de desarrollo, supervivencia y tiempo hasta la metamorfosis. Se incorporaron estas características biológicas en la evaluación de la factibilidad de realizar ensayos de toxicidad aguda y crónica con las larvas de estas especies.

En los distintos capítulos de este trabajo de tesis se realizan introducciones teóricas de los temas involucrados en la investigación. Entre ellas se desarrolla la necesidad de contar con metodologías de diagnóstico, ya sea en evaluaciones de riesgo ambiental o en la determinación de la calidad del agua; se fundamenta la importancia de los bioensayos como herramienta bioanalítica; se realizan distintas consideraciones acerca de los bioensayos de toxicidad aguda, sus usos y su precisión, mencionándose las distintas propuestas de ensayos estandarizados por parte de organismos internacionales. También se discute la necesidad de generar protocolos con especies autóctonas y se profundiza el estudio de sensibilidad en los anuros. En este último sentido, se introducen distintos aspectos básicos de la biología, fisiología, anatomía y otras consideraciones generales de los anuros involucrados en la respuesta frente a los contaminantes y se menciona el origen y estado de la información actual acerca de esos aspectos, que sirvieron de base para los estudios realizados en

el área de la toxicología acuática. Finalmente se describe el grado de avance del conocimiento en esta área temática en nuestro país.

Se efectuaron un total de 58 bioensayos de toxicidad aguda mediante la metodología propuesta. La misma fue el punto de comparación asumido como válido para contrastar las diferentes hipótesis planteadas y cumplir con los objetivos propuestos en el trabajo de tesis. En primer lugar se realizó un estudio detallado de la respuesta de huevos, embriones y larvas de *Hypsiboas pulchellus* al Cr(VI) bajo diferentes condiciones de ensayo, en exposiciones agudas y crónicas. Se evaluó la variabilidad no esperada en la respuesta de esta especie a lo largo de toda la fase de su vida acuática frente a diferentes condiciones controladas de laboratorio; la contrastación de distintas hipótesis respecto a los factores modificadores de la toxicidad sobre larvas de *H. pulchellus* en bioensayos de toxicidad aguda; el desarrollo de una serie de pasos metodológicos, base para realizar la estandarización de este bioensayo y la determinación de la sensibilidad de la especie. Se describen además los procedimientos metodológicos asociados al diseño, ejecución, análisis e interpretación de los bioensayos utilizados.

Posteriormente, esta metodología propuesta fue aplicada al estudio de los efectos cromo (VI) sobre las poblaciones de anuros que habitan el área de estudio, lo que permitió la comparación, mediante pruebas estadísticas, de las sensibilidades ofrecidas por las distintas especies al tóxico, además de posibilitar la realización de comparaciones entre las posibles fuentes de variación que se presentaron en el transcurso de los experimentos (como parte del error experimental), entre experimentos, y con metodologías aplicadas en distintos trabajos hallados en la literatura científica.

Entre los aportes de esta investigación, se concluye que las larvas de las especies de anuros estudiadas son organismos adecuados para realizar experimentos de laboratorio, ya sea ensayos bioecológicos o estudios de toxicidad (bioensayos). Se demuestra que la contaminación por cromo afecta la fase de vida acuática de los anuros estudiados, ejerciendo efectos nocivos: alteraciones en el comportamiento (natación), inhibición del crecimiento, distinto tipo y grado de malformaciones y muerte sobre los diversos estadios del desarrollo de todas las especies estudiadas. Por otra parte se realizan hallazgos relacionados con la exposición prolongada frente a las concentraciones subletales altas de cromo, como la exaltación del crecimiento. Se generan las líneas de base necesarias para poder considerar a *H. pulchellus* como una especie de referencia, en el desarrollo de herramientas bioanalíticas estandarizadas y el uso potencial del sistema de diagnóstico en el monitoreo regional de efectos biológicos dentro de programas de control ambiental.

Respecto al estudio de larvas de diversas especies de la taxocomunidad estudiada, se concluye que existen diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad que presentan respecto al cromo (VI); que la contaminación producida por cromo no afecta igualmente a las diferentes especies de una comunidad, ya que éstas no responden de la misma manera ante un tóxico y que su posibilidad de exposición se encuentra relacionada con particularidades de su biología (estrategia reproductiva, hábito de vida).

De las especies presentes en la comunidad estudiada, teniendo en cuenta su performance en el laboratorio y su sensibilidad al cromo, se propone a *Scinax squalirostris* como la especie más sensible a considerar en futuras selecciones de especies centinelas o indicadoras de deterioro en ecosistemas acuáticos de la región o riesgos potenciales sobre ecosistemas acuáticos naturales y modificados. Se advierte que, teniendo en cuenta los niveles de sensibilidad de las especies de la taxocomunidad estudiada, junto a los valores umbrales de efecto letal y subletal encontrados en el presente estudio, se esperaría que las concentraciones de cromo detectadas en cuerpos de agua contaminados de la región signifiquen un riesgo para algunas de estas especies. Por otra parte, se realiza una comparación descriptiva de la sensibilidad de las especies estudiadas respecto a la encontrada para otros organismos acuáticos de distintas regiones.

Finalmente, consideramos que este trabajo brinda información básica sobre ecotoxicología de anuros autóctonos, y presenta de manera clara el panorama actual de esta ciencia en la Argentina, mostrando los huecos existentes en la investigación y dejando ver los caminos a seguir; aporta elementos para responder las preguntas formuladas, presentando a su vez nuevas preguntas de investigación y enunciando nuevas hipótesis producto de la investigación. Asimismo brinda elementos para abordar la discusión acerca del posible empleo de anuros como indicadores o centinelas de la contaminación, además de contar con mayor información sobre su posible sensibilidad y susceptibilidad a los distintos agentes contaminantes o de estrés químico.

ABSTRACT

Human activity produces a great quantity and variety of toxic wastes which in different ways are spilt to the enclosures of ecosystems. Generally the natural systems have a determined capacity to bear changes due to the presence of xenobiotic agents by means of internal purifying processes. The damage of an ecosystem takes place when quantity of said wastes is such that they exceed its capacity to recover. Lamentably nowadays and since the last two decades the flowage of polluting agents has increased and has largely exceeded the established limits without assessing their potential effects, producing in extreme cases irretrievable damages.

Concerning the environmental pollutants, heavy metals are important because they cause high toxicity levels, even in very low concentrations. Men continuously introduce metals in water ecosystems which frequently surpass the limits of purification of these natural systems. In the special case of chromium, the presence of hexavalent chromium in water environments is closely related to anthropic sources: industrial oxidation in mines and chromium deposits, combustion of fossil fuels, wood, paper, alloys, catalysis, pigments, wood preservation and steel, glass, cement and tannin industries.

In this thesis hexavalent chromium was chosen, obtained by the solution of potassium dichromate in essay water, as a reference toxic. Although hexavalent chromium is not a polluting agent which may be a problem in present society, it presents effects on the water ecosystems and human health due to its physicochemical properties and its distribution in the environment. Concerning its managing in laboratory, the hexavalent chromium thus obtained, has advantages to make bioessays, because it is a primary pattern.

The proposed model of research states a study system in which the impact that human activities have upon the biosphere will be generally analyzed. This cause-effect relationship is maintained, and the scale of the system decreases towards a subsystem of study which is reachable and measurable. This subsystem is formed by, on one side the chemical pollution of anthropic origin which is introduced in the natural systems as an impact factor, being the hexavalent chromium the representative component, and on the other side the larvae of the different anuran species that live in ponds chosen as representative of the biota component, one of the enclosures of the water ecosystem selected, which would be part of a larger system, the environment or nature.

The anuran amphibians are the most advanced vertebrates which maintain free life larvae. The existence of a biphasic cycle of life (with aquatic larvae that carry out a metamorphosis to originate a terrestrial organism), plus its eggs having no shells, generates in many cases an exposed ontogeny which allows the analysis of its development in comparison with other groups of tetrapodes. As they are ectothermic vertebrates, the activity of the anurans is closely related to the physical changes of water and terrestrial environment. Their skin is a complex organ which constitutes the principal route of interchange of gases for

breathing, water and ions, being remarkably exposed to toxic action exposure. They do not emigrate from the place where they burn (completing their life cycle in the same place), which makes them excellent indicators and recorders of local conditions. They have a large morphological diversity and they are present in most ecosystems, covering also a great deal of habitats. Because of these reasons anuran amphibians have been proposed in many cases as indicator organisms of environmental impact and ecologic risk.

The chosen study system was a field of approximately 300 hectares, located in the flooding plain of El Pescado brook, in the middle of its course (35°01'08" S; 57°51'28"W). Two temporary ponds were chosen inside the brook, used as reproductive sites by the different anuran species present in the place. In each one a morphological, and flora and fauna description was carried out (lists of species of the different population of vertebrates that live in or go to those ponds), and a physicochemical characterization of the water.

Specifically, 248 samplings were carried out between January 1998 and December 2004 as a part of the monitoring of larvae and adults of the different populations of anurans that lived in the study area. Complementary laboratory studies were carried out from which basic information was generated about the biology of 16 species of native anurans, describing basic aspects of their reproductive biology, development in their water life phase, aspects of their subsistence in captivity, breeding conditions, and the effect that different modifying factors have on: growing rate, development rate, survival and time until metamorphosis is reached. These biological characteristics were incorporated in the evaluation of feasibility to carry out essays of acute and chronic toxicity with the larvae of these species.

Theoretical introductions of the subjects involved in the investigation are carried out in the different chapters of this work. Among them it is necessary to carry out diagnostic methods, be it in environmental risk evaluations or in the determination of water quality. The importance of bioassays as a bioanalytical tool is established, different considerations about the bioassays of acute toxicity, their uses and accuracy are made, mentioning the different assay proposals of standard essays made by international organisms. Also the necessity of generating protocols with native species is discussed and the study of sensitivity in the anurans is deepened. On this last aspect different basic aspects of the biology and physiology of anurans involved in the response to pollution are introduced. The origin and condition of present information about biology, physiology, anatomy and other general considerations of the anurans which served as basis for the studies carried out in the water toxicology area are mentioned. Finally, the condition and rate of advance of knowledge in this thematic area is described.

58 essays of acute toxicity were carried out using the proposed methodology. The same was the point of comparison considered valid to contrast the different established hypothesis and comply with the goals proposed in this thesis work. In the first place, a detailed study took place on the response of eggs, embryos and larvae of *Hypsiboas pulchellus* to Cr(VI) under different conditions of essay, in acute and chronic exposures. The unexpected variability was evaluated in the

response of this species all along her aquatic life in front of different controlled conditions in laboratory; the contrast of different hypothesis respecting the modifying factors of toxicity on larvae of *H. pulchellus* in bioassays of acute toxicity; the development of a series of methodological steps, the base to reach the standard of this bioassay and the determination of the species sensitivity. The methodological proceedings associated to the design, execution, analysis and interpretation of the bioassays used are also described.

Subsequently this proposed methodology was applied to the study of the chromium (VI) effects on the anuran population that lives in the study area, which allowed the comparison, by means of statistic tests, of the sensibilities that the different species suffer from the action of the toxic, also allowing the comparison among the possible sources of variation that appeared in the course of the experiments (as a part of experimental error), among experiments and with methodologies applied in different works found in scientific literature.

Among its contributions, the conclusion is that the anuran species studied are adequate organisms to carry out experiments in the laboratory, be they bioecological essays or toxicity studies (bioassays). It is demonstrated that the chromium pollution has an effect on the water life of the studied anuran, having harmful effects: alterations in their behavior (swimming), inhibition of growth, and different rates of malformation and death upon different phases of development in all the studied species. Otherwise new findings are made related to high chromium sublethal concentrations, such as abnormal elevation of growth. Base lines are generated necessary to consider *H. pulchellus* as a reference species, in the development of standard bioanalytical tools and potential use of diagnosis system in the regional management of biological effects within the environmental control programs.

Related to the study of larvae of different species of the studied taxocommunity, it is concluded that there are significant differences between them concerning the sensibility to chromium (VI); that the pollution produced by chromium does not act in the same way in the different species of a community, as they do not respond in the same way in the presence of a toxic and their possibility to be exposed is related to the peculiarities of their biology (reproductive strategy, life habits).

Of the species present in the studied community, bearing in mind their laboratory performance and their sensibility to chromium, *Scinax squalirostris* is proposed as a indicator species of damage in water ecosystems of the region or potential risks in natural and modified water ecosystems. Warnings are stated stressing that bearing in mind the sensibility levels of the studied taxocommunity species, together with the threshold values of lethal and sublethal effect found in the present study, it would be expected that the chromium concentrations found in bodies of polluted waters of the zone may mean a risk for some of these species. On the other hand a descriptive comparison is made of the sensibility of the studied species referred to the sensibility found in other aquatic organisms of different zones.

Finally we consider that this work offers basic information about ecotoxicology of native anurans and clearly shows the present state of this science in Argentina, showing the existing voids in research and points out the paths to follow. It gives elements to answer the posed research questions, presenting also new questions and stating new hypothesis proceeding from the research. It offers elements to enter in a discussion of the possible use of anurans as indicators or sentries of pollution, and also to have more information about their possible sensibility and susceptibility to the different polluting agents or to chemical stress.

RESUMEN

La actividad humana produce gran cantidad y variedad de desechos tóxicos que son volcados de diferentes modos a los compartimentos de los ecosistemas. En general, los sistemas naturales poseen una determinada capacidad para soportar alteraciones debidas a la presencia de agentes xenobióticos mediante procesos internos de depuración. El deterioro de un ecosistema se produce cuando la cantidad de desechos introducidos superan su capacidad de recuperación. Lamentablemente, en la actualidad y durante las dos últimas décadas, los flujos de contaminantes han aumentado y se han superado ampliamente los umbrales establecidos, sin evaluar sus efectos potenciales, llegando en casos extremos a producir daños irreparables.

En lo que concierne a contaminantes ambientales, son de importancia los metales pesados, debido a que se les asocia una elevada toxicidad, incluso a muy bajas concentraciones. El hombre genera una continua introducción de metales en los ecosistemas acuáticos, los que superan frecuentemente los niveles umbrales de depuración de estos sistemas naturales. En el caso particular del cromo, la presencia de cromo hexavalente en los ambientes acuáticos está estrechamente relacionada con fuentes antrópicas: oxidación industrial de minas y depósitos de cromo, combustión de combustibles fósiles, madera, papel, aleaciones, catálisis, pigmentos, preservación de la madera e industrias del acero, vidrio, cemento y tanino.

En el presente trabajo de tesis se seleccionó al cromo hexavalente, obtenido por disolución de dicromato de potasio en agua de ensayo, como tóxico referencia. Si bien el cromo hexavalente no es un contaminante que constituya un problema para la sociedad actual, debido a sus propiedades fisicoquímicas y su distribución en el ambiente, presenta efectos sobre los ecosistemas acuáticos y la salud humana. Respecto a su manejo en laboratorio, el cromo hexavalente obtenido a partir de dicromato de potasio en solución acuosa, presenta ventajas para realizar bioensayos, debido a que es un patrón primario.

El modelo de investigación propuesto plantea un sistema de estudio en el cual se analizará de manera general el impacto que las actividades humanas tienen sobre la biosfera. Esta relación causa-efecto se mantiene, disminuyéndose la escala del sistema hacia un subsistema de estudio, abordable y mensurable. Este subsistema posee dos integrantes: por un lado, la contaminación química de origen antrópico que se introduce como un factor de impacto en los sistemas naturales, siendo el cromo hexavalente el componente representativo; por otro lado, las larvas de las distintas especies de anuros que habitan las charcas seleccionadas, como representantes del componente de la biota, uno de los compartimentos del ecosistema acuático seleccionado, el que formaría parte de un sistema mayor, la biosfera o la naturaleza.

Los anfibios anuros son los vertebrados más avanzados que conservan larvas de vida libre. La existencia de un ciclo de vida bifásico (con larvas acuáticas que sufren metamorfosis para originar un organismo terrestre), sumado a que sus huevos no tienen cáscara, genera en muchos casos una ontogenia

expuesta que facilita el análisis de su desarrollo en comparación con otros grupos de tetrápodos. Siendo vertebrados ectotérmicos, la actividad de los anuros está estrechamente relacionada con las variables físicas de los ambientes acuático y terrestre. Su piel es un órgano complejo que constituye la ruta principal de intercambio de gases para la respiración, agua e iones; quedando particularmente expuestos a la acción de tóxicos. No emigran del sitio en el cual eclosionan (completando su ciclo de vida en ese mismo lugar), lo cual los hace excelentes indicadores y registros de las condiciones locales. Poseen una gran diversidad morfológica y están presentes en la mayor parte de los ecosistemas, abarcando también una gran cantidad de hábitats. Por estas razones los anfibios anuros han sido propuestos en muchos casos como organismos centinelas o indicadores de impacto ambiental y riesgo ecológico.

El sistema de estudio seleccionado fue un campo de aproximadamente 300 hectáreas, situado en la planicie de inundación del arroyo El Pescado, a mitad de su recorrido (35°01'08"S; 57°51'28"O). Dentro del mismo se seleccionaron dos charcas temporarias, utilizadas como sitios reproductivos por las diferentes especies de anuros presentes en el lugar. De cada una de ellas se realizó una descripción morfológica, florística y faunística (listados de especies de las distintas poblaciones de vertebrados que frecuentan o habitan estos limnotopos) y una caracterización fisicoquímica del agua.

Particularmente se realizaron 248 muestreos entre enero de 1998 y diciembre de 2004 como parte de un monitoreo de larvas y adultos de las distintas poblaciones de anuros que habitaban el área de estudio. Complementariamente se efectuaron estudios de laboratorio a partir de los cuales se generó información básica sobre la biología de 16 especies de anuros autóctonos, describiendo aspectos básicos de su biología reproductiva, desarrollo en su fase de vida acuática, aspectos de su mantenimiento en cautiverio, condiciones de cría, y el efecto que ejercen diferentes factores modificantes sobre la tasa de crecimiento, tasa de desarrollo, supervivencia y tiempo hasta la metamorfosis. Se incorporaron estas características biológicas en la evaluación de la factibilidad de realizar ensayos de toxicidad aguda y crónica con las larvas de estas especies.

En los distintos capítulos de este trabajo de tesis se realizan introducciones teóricas de los temas involucrados en la investigación. Entre ellas se desarrolla la necesidad de contar con metodologías de diagnóstico, ya sea en evaluaciones de riesgo ambiental o en la determinación de la calidad del agua; se fundamenta la importancia de los bioensayos como herramienta bioanalítica; se realizan distintas consideraciones acerca de los bioensayos de toxicidad aguda, sus usos y su precisión, mencionándose las distintas propuestas de ensayos estandarizados por parte de organismos internacionales. También se discute la necesidad de generar protocolos con especies autóctonas y se profundiza el estudio de sensibilidad en los anuros. En este último sentido, se introducen distintos aspectos básicos de la biología, fisiología, anatomía y otras consideraciones generales de los anuros involucrados en la respuesta frente a los contaminantes y se menciona el origen y estado de la información actual acerca de esos aspectos, que sirvieron de base para los estudios realizados en

el área de la toxicología acuática. Finalmente se describe el grado de avance del conocimiento en esta área temática en nuestro país.

Se efectuaron un total de 58 bioensayos de toxicidad aguda mediante la metodología propuesta. La misma fue el punto de comparación asumido como válido para contrastar las diferentes hipótesis planteadas y cumplir con los objetivos propuestos en el trabajo de tesis. En primer lugar se realizó un estudio detallado de la respuesta de huevos, embriones y larvas de *Hypsiboas pulchellus* al Cr(VI) bajo diferentes condiciones de ensayo, en exposiciones agudas y crónicas. Se evaluó la variabilidad no esperada en la respuesta de esta especie a lo largo de toda la fase de su vida acuática frente a diferentes condiciones controladas de laboratorio; la contrastación de distintas hipótesis respecto a los factores modificadores de la toxicidad sobre larvas de *H. pulchellus* en bioensayos de toxicidad aguda; el desarrollo de una serie de pasos metodológicos, base para realizar la estandarización de este bioensayo y la determinación de la sensibilidad de la especie. Se describen además los procedimientos metodológicos asociados al diseño, ejecución, análisis e interpretación de los bioensayos utilizados.

Posteriormente, esta metodología propuesta fue aplicada al estudio de los efectos cromo (VI) sobre las poblaciones de anuros que habitan el área de estudio, lo que permitió la comparación, mediante pruebas estadísticas, de las sensibilidades ofrecidas por las distintas especies al tóxico, además de posibilitar la realización de comparaciones entre las posibles fuentes de variación que se presentaron en el transcurso de los experimentos (como parte del error experimental), entre experimentos, y con metodologías aplicadas en distintos trabajos hallados en la literatura científica.

Entre los aportes de esta investigación, se concluye que las larvas de las especies de anuros estudiadas son organismos adecuados para realizar experimentos de laboratorio, ya sea ensayos bioecológicos o estudios de toxicidad (bioensayos). Se demuestra que la contaminación por cromo afecta la fase de vida acuática de los anuros estudiados, ejerciendo efectos nocivos: alteraciones en el comportamiento (natación), inhibición del crecimiento, distinto tipo y grado de malformaciones y muerte sobre los diversos estadios del desarrollo de todas las especies estudiadas. Por otra parte se realizan hallazgos relacionados con la exposición prolongada frente a las concentraciones subletales altas de cromo, como la exaltación del crecimiento. Se generan las líneas de base necesarias para poder considerar a *H. pulchellus* como una especie de referencia, en el desarrollo de herramientas bioanalíticas estandarizadas y el uso potencial del sistema de diagnóstico en el monitoreo regional de efectos biológicos dentro de programas de control ambiental.

Respecto al estudio de larvas de diversas especies de la taxocomunidad estudiada, se concluye que existen diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad que presentan respecto al cromo (VI); que la contaminación producida por cromo no afecta igualmente a las diferentes especies de una comunidad, ya que éstas no responden de la misma manera ante un tóxico y que su posibilidad de exposición se encuentra relacionada con particularidades de su biología (estrategia reproductiva, hábito de vida).

De las especies presentes en la comunidad estudiada, teniendo en cuenta su performance en el laboratorio y su sensibilidad al cromo, se propone a *Scinax squalirostris* como la especie más sensible a considerar en futuras selecciones de especies centinelas o indicadoras de deterioro en ecosistemas acuáticos de la región o riesgos potenciales sobre ecosistemas acuáticos naturales y modificados. Se advierte que, teniendo en cuenta los niveles de sensibilidad de las especies de la taxocomunidad estudiada, junto a los valores umbrales de efecto letal y subletal encontrados en el presente estudio, se esperaría que las concentraciones de cromo detectadas en cuerpos de agua contaminados de la región signifiquen un riesgo para algunas de estas especies. Por otra parte, se realiza una comparación descriptiva de la sensibilidad de las especies estudiadas respecto a la encontrada para otros organismos acuáticos de distintas regiones.

Finalmente, consideramos que este trabajo brinda información básica sobre ecotoxicología de anuros autóctonos, y presenta de manera clara el panorama actual de esta ciencia en la Argentina, mostrando los huecos existentes en la investigación y dejando ver los caminos a seguir; aporta elementos para responder las preguntas formuladas, presentando a su vez nuevas preguntas de investigación y enunciando nuevas hipótesis producto de la investigación. Asimismo brinda elementos para abordar la discusión acerca del posible empleo de anuros como indicadores o centinelas de la contaminación, además de contar con mayor información sobre su posible sensibilidad y susceptibilidad a los distintos agentes contaminantes o de estrés químico.

ABSTRACT

Human activity produces a great quantity and variety of toxic wastes which in different ways are spilt to the enclosures of ecosystems. Generally the natural systems have a determined capacity to bear changes due to the presence of xenobiotic agents by means of internal purifying processes. The damage of an ecosystem takes place when quantity of said wastes is such that they exceed its capacity to recover. Lamentably nowadays and since the last two decades the flowage of polluting agents has increased and has largely exceeded the established limits without assessing their potential effects, producing in extreme cases irretrievable damages.

Concerning the environmental pollutants, heavy metals are important because they cause high toxicity levels, even in very low concentrations. Men continuously introduce metals in water ecosystems which frequently surpass the limits of purification of these natural systems. In the special case of chromium, the presence of hexavalent chromium in water environments is closely related to anthropic sources: industrial oxidation in mines and chromium deposits, combustion of fossil fuels, wood, paper, alloys, catalysis, pigments, wood preservation and steel, glass, cement and tannin industries.

In this thesis hexavalent chromium was chosen, obtained by the solution of potassium dichromate in essay water, as a reference toxic. Although hexavalent chromium is not a polluting agent which may be a problem in present society, it presents effects on the water ecosystems and human health due to its physicochemical properties and its distribution in the environment. Concerning its managing in laboratory, the hexavalent chromium thus obtained, has advantages to make bioessays, because it is a primary pattern.

The proposed model of research states a study system in which the impact that human activities have upon the biosphere will be generally analyzed. This cause-effect relationship is maintained, and the scale of the system decreases towards a subsystem of study which is reachable and measurable. This subsystem is formed by, on one side the chemical pollution of anthropic origin which is introduced in the natural systems as an impact factor, being the hexavalent chromium the representative component, and on the other side the larvae of the different anuran species that live in ponds chosen as representative of the biota component, one of the enclosures of the water ecosystem selected, which would be part of a larger system, the environment or nature.

The anuran amphibians are the most advanced vertebrates which maintain free life larvae. The existence of a biphasic cycle of life (with aquatic larvae that carry out a metamorphosis to originate a terrestrial organism), plus its eggs having no shells, generates in many cases an exposed ontogeny which allows the analysis of its development in comparison with other groups of tetrapodes. As they are ectothermic vertebrates, the activity of the anurans is closely related to the physical changes of water and terrestrial environment. Their skin is a complex organ which constitutes the principal route of interchange of gases for

breathing, water and ions, being remarkably exposed to toxic action exposure. They do not emigrate from the place where they burn (completing their life cycle in the same place), which makes them excellent indicators and recorders of local conditions. They have a large morphological diversity and they are present in most ecosystems, covering also a great deal of habitats. Because of these reasons anuran amphibians have been proposed in many cases as indicator organisms of environmental impact and ecologic risk.

The chosen study system was a field of approximately 300 hectares, located in the flooding plain of El Pescado brook, in the middle of its course (35°01'08" S; 57°51'28"W). Two temporary ponds were chosen inside the brook, used as reproductive sites by the different anuran species present in the place. In each one a morphological, and flora and fauna description was carried out (lists of species of the different population of vertebrates that live in or go to those ponds), and a physicochemical characterization of the water.

Specifically, 248 samplings were carried out between January 1998 and December 2004 as a part of the monitoring of larvae and adults of the different populations of anurans that lived in the study area. Complementary laboratory studies were carried out from which basic information was generated about the biology of 16 species of native anurans, describing basic aspects of their reproductive biology, development in their water life phase, aspects of their subsistence in captivity, breeding conditions, and the effect that different modifying factors have on: growing rate, development rate, survival and time until metamorphosis is reached. These biological characteristics were incorporated in the evaluation of feasibility to carry out essays of acute and chronic toxicity with the larvae of these species.

Theoretical introductions of the subjects involved in the investigation are carried out in the different chapters of this work. Among them it is necessary to carry out diagnostic methods, be it in environmental risk evaluations or in the determination of water quality. The importance of bioassays as a bioanalytical tool is established, different considerations about the bioassays of acute toxicity, their uses and accuracy are made, mentioning the different assay proposals of standard essays made by international organisms. Also the necessity of generating protocols with native species is discussed and the study of sensitivity in the anurans is deepened. On this last aspect different basic aspects of the biology and physiology of anurans involved in the response to pollution are introduced. The origin and condition of present information about biology, physiology, anatomy and other general considerations of the anurans which served as basis for the studies carried out in the water toxicology area are mentioned. Finally, the condition and rate of advance of knowledge in this thematic area is described.

58 essays of acute toxicity were carried out using the proposed methodology. The same was the point of comparison considered valid to contrast the different established hypothesis and comply with the goals proposed in this thesis work. In the first place, a detailed study took place on the response of eggs, embryos and larvae of *Hypsiboas pulchellus* to Cr(VI) under different conditions of essay, in acute and chronic exposures. The unexpected variability was evaluated in the

response of this species all along her aquatic life in front of different controlled conditions in laboratory; the contrast of different hypothesis respecting the modifying factors of toxicity on larvae of *H. pulchellus* in bioassays of acute toxicity; the development of a series of methodological steps, the base to reach the standard of this bioassay and the determination of the species sensitivity. The methodological proceedings associated to the design, execution, analysis and interpretation of the bioassays used are also described.

Subsequently this proposed methodology was applied to the study of the chromium (VI) effects on the anuran population that lives in the study area, which allowed the comparison, by means of statistic tests, of the sensibilities that the different species suffer from the action of the toxic, also allowing the comparison among the possible sources of variation that appeared in the course of the experiments (as a part of experimental error), among experiments and with methodologies applied in different works found in scientific literature.

Among its contributions, the conclusion is that the anuran species studied are adequate organisms to carry out experiments in the laboratory, be they bioecological essays or toxicity studies (bioassays). It is demonstrated that the chromium pollution has an effect on the water life of the studied anuran, having harmful effects: alterations in their behavior (swimming), inhibition of growth, and different rates of malformation and death upon different phases of development in all the studied species. Otherwise new findings are made related to high chromium sublethal concentrations, such as abnormal elevation of growth. Base lines are generated necessary to consider *H. pulchellus* as a reference species, in the development of standard bioanalytical tools and potential use of diagnosis system in the regional management of biological effects within the environmental control programs.

Related to the study of larvae of different species of the studied taxocommunity, it is concluded that there are significant differences between them concerning the sensibility to chromium (VI); that the pollution produced by chromium does not act in the same way in the different species of a community, as they do not respond in the same way in the presence of a toxic and their possibility to be exposed is related to the peculiarities of their biology (reproductive strategy, life habits).

Of the species present in the studied community, bearing in mind their laboratory performance and their sensibility to chromium, *Scinax squalirostris* is proposed as a indicator species of damage in water ecosystems of the region or potential risks in natural and modified water ecosystems. Warnings are stated stressing that bearing in mind the sensibility levels of the studied taxocommunity species, together with the threshold values of lethal and sublethal effect found in the present study, it would be expected that the chromium concentrations found in bodies of polluted waters of the zone may mean a risk for some of these species. On the other hand a descriptive comparison is made of the sensibility of the studied species referred to the sensibility found in other aquatic organisms of different zones.

Finally we consider that this work offers basic information about ecotoxicology of native anurans and clearly shows the present state of this science in Argentina, showing the existing voids in research and points out the paths to follow. It gives elements to answer the posed research questions, presenting also new questions and stating new hypothesis proceeding from the research. It offers elements to enter in a discussion of the possible use of anurans as indicators or sentries of pollution, and also to have more information about their possible sensibility and susceptibility to the different polluting agents or to chemical stress.

CAPÍTULO I

Marco teórico

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La actividad humana produce gran cantidad y variedad de desechos tóxicos que son volcados de diferentes modos a los compartimentos de los ecosistemas. La introducción de un determinado desecho de origen antrópico puede o no producir desequilibrios en un ecosistema que, potencialmente, conduzca a su deterioro.

Actualmente se manejan criterios mediante los que a las sustancias tóxicas individuales se les asigna una concentración umbral, por encima de la cual se detectan efectos responsables de dichos desequilibrios (Cairns *et al.*, 1986). En general, los sistemas naturales poseen una determinada capacidad para soportar alteraciones debidas a la presencia de agentes xenobióticos mediante procesos internos de depuración. El deterioro de un ecosistema se produce cuando la cantidad y calidad de desechos introducidos superan su capacidad de recuperación. Lamentablemente en la actualidad y desde las dos últimas décadas los flujos de contaminantes han aumentado y se han superado ampliamente los umbrales establecidos sin evaluar sus efectos potenciales, llegando en casos extremos a producir daños irreparables (Buikema *et al.*, 1982; Vouk *et al.*, 1985; Bordeau *et al.*, 1990; Burton, 1990).

1.1 Antecedentes de la investigación

1.1.a Campo general de la investigación

Actualmente, la calidad de las aguas a escala mundial es objeto de constante preocupación desde dos puntos de vista: a) salud pública y calidad de vida y b) salud de los ecosistemas acuáticos. Para poder tomar decisiones adecuadas a la hora de intentar disminuir el impacto de las actividades humanas sobre los sistemas acuáticos, es necesario contar con información proveniente de las distintas ramas de las ciencias ambientales (Spiro y Stigliani, 2004). Es la información proveniente de la Ecotoxicología la que contempla el estudio de los efectos biológicos de los xenobióticos sobre especies representativas de los ecosistemas acuáticos, mediante la realización de ensayos de toxicidad en laboratorio (Truhaut, 1977; Suter, 1993; Environmental Canada, 1999; Ronco y Díaz-Báez, 2004). Esta nueva ciencia ha desarrollado en las últimas décadas una visión integradora, al considerar los conocimientos derivados de la Toxicología y la Ecología clásicas, diseñando herramientas de diagnóstico más realistas, que se ajustan a las necesidades actuales, facilitando la toma de “mejores” decisiones ante los problemas planteados por la contaminación en la sociedad moderna.

1.1.b Contaminación por metales

En lo que concierne a contaminantes ambientales, son de importancia los metales pesados debido a que se les asocia una elevada toxicidad, incluso a muy bajas concentraciones.

La contaminación por metales pesados está relacionada en mayor medida a la actividad urbano-industrial, minera y en menor grado a la agricultura. Si bien los metales están naturalmente presentes en los sistemas acuáticos, no pueden ser degradados.

El hombre, al explotar y modificar el ambiente de acuerdo a sus necesidades, genera una continua introducción de metales en los ecosistemas acuáticos, lo cual supera los niveles umbrales de depuración de estos sistemas naturales. De esta manera las concentraciones exceden los valores naturales pre-existentes, generando disturbios en el normal funcionamiento de los mismos, acumulándose y llegando a alcanzar niveles tóxicos. El extenso uso de metales en diferentes actividades humanas, principalmente industriales, ha sido ampliamente informado por Linder y Grillitsch (2000).

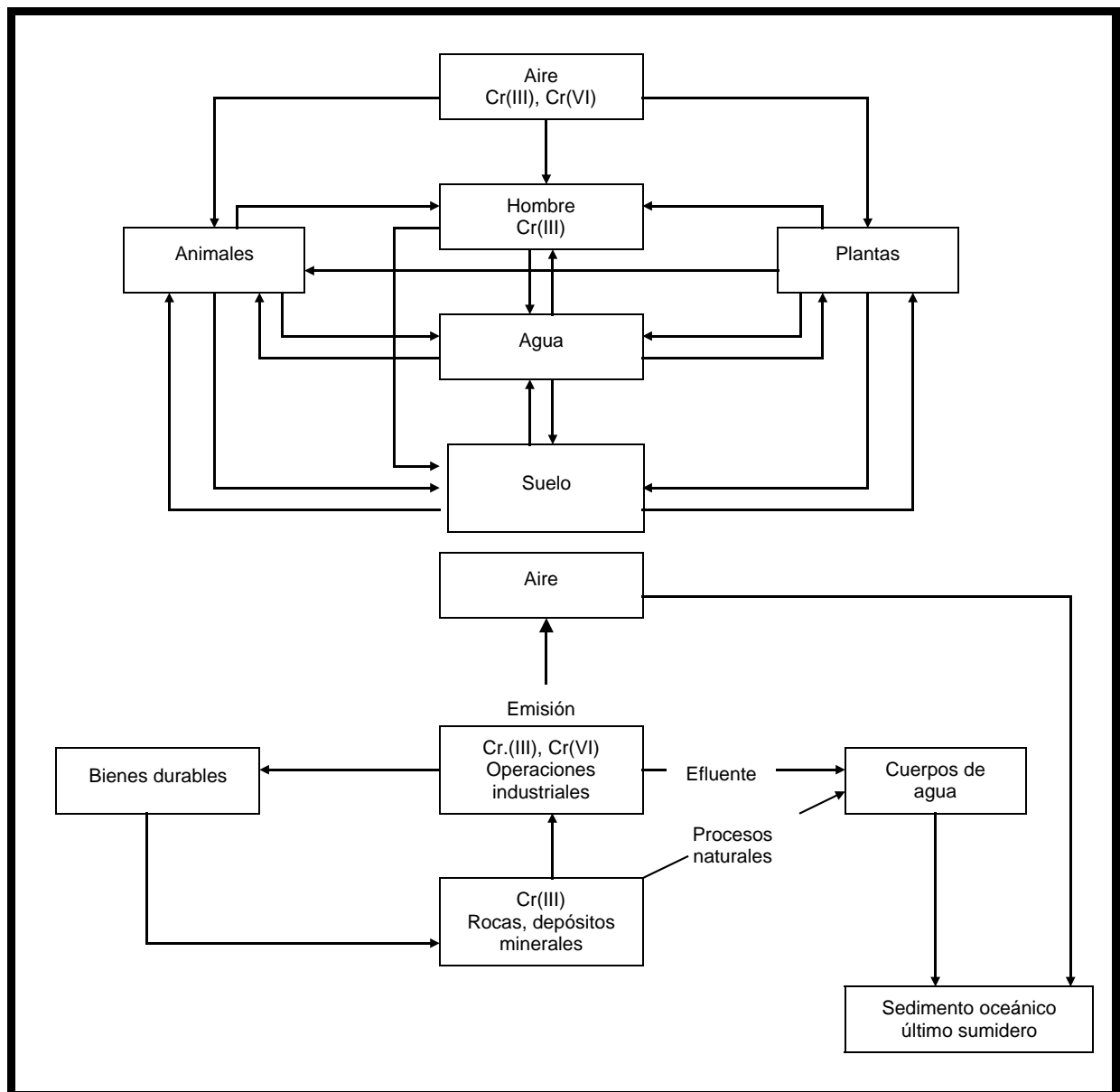
1.1.c Contaminación por cromo y efectos asociados.

Origen y distribución del cromo en el ambiente

El cromo es ubicuo en la naturaleza, presentando los sitios no contaminados concentraciones de 1 microgramo/litro en agua, un microgramo/metro cúbico en aire y entre 2 y 60 mg/kg en suelos, por valores superiores a 0,19 mg/kg de peso seco en las plantas, 5 mg/kg en rocas graníticas y 1800 mg/kg en rocas ultra-magmáticas básicas, siendo los depósitos naturales más importantes los del estado de oxidación III. El ciclo biogeoquímico de este elemento, implicaría el traslado desde rocas y suelos hacia el agua, pasando por la biota, el aire y regresando al suelo (Figura 1, página siguiente). Una cantidad estimada de 6,7 millones de kg por año es desviada de este ciclo por escorrentía superficial hacia los arroyos y vertida en el océano, siendo aquí los sedimentos su destino final. (IPCS, WHO, 1988). A pesar de que se conoce su ciclo, no es demasiada la información disponible en la literatura científica sobre los factores que influyen sobre la movilización, migración y biodisponibilidad del cromo en la biosfera.

La presencia de cromo hexavalente en los ambientes acuáticos está estrechamente relacionada con fuentes antrópicas. Deriva de manera general, de la oxidación industrial de las minas y depósitos de cromo, y posiblemente de la combustión de combustibles fósiles, madera, papel y otros (IPCS, WHO, 1988). En particular el cromo es utilizado en aleaciones, catálisis, pigmentos, preservación de la madera y en las industrias como la del acero, vidrio, cemento y tanino (Abasi y Soni, 1984; Goyer, 1996).

Figura 1 Ciclo biogeoquímico del cromo, tomado de IPCS, WHO (1988)



El dicromato de potasio y el dicromato de sodio han sido empleados ampliamente en procesos industriales (fabricación de pigmentos minerales, curtidos de pieles y cueros, tinturas de fábricas textiles y litografía), como fuentes de otros compuestos de cromo, particularmente como óxido de cromo (VI). Este proceso es la mayor fuente de contaminación por cromo hexavalente (USEPA, 1978). (Ver en la Tabla 1, página siguiente, la caracterización fisicoquímica del cromo y algunos de sus compuestos).

Tabla 1 Propiedades fisicoquímicas del Cr y algunos compuestos del mismo

Nombre	Estado de oxidación del Cr	Fórmula química	Peso molecular relativo	Densidad (g/cm ³)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Color	Solubilidad en agua (% P/P)	Número registro CAS
Cromo	0	Cr	51,996	7,19	1857	2672	Gris	insoluble	7440-47-3
Óxido de cromo	III	Cr ₂ O ₃	151,99	5,21	2266	4000	Verde	Insoluble	1308-38-9
Óxido de cromo	VI	CrO ₃	99,99	2,70	196	Descompone	Rojo	62,41	1333-82-0
Cromato de potasio	VI	K ₂ CrO ₄	194,20	2,732	968,3	Descompone	Amarillo	39,96	7789-00-6
Dicromato de potasio	VI	K ₂ Cr ₂ O ₇	294,19	2,676	398	Descompone	Rojo	11,7	7778-50-9
Cromato de calcio dihidratado	VI	CaCrO ₄ x 2H ₂ O	192,09	-	1025	Descompone	Amarillo	3,5	13765-19-0
Cromito de calcio	III	CaCr ₂ O ₄	208,07	4,8	2090	-	Verde oliva	insoluble	

Según (Barnhart, 1997), el cromo posee tres características químicas fundamentales que explican su comportamiento en el ambiente y su papel en la salud humana: i) puede poseer todos los estados de oxidación desde (-2) a (+6), pero en la naturaleza el cromo trivalente es la forma más abundante, ii) las demás formas tenderán a convertirse en óxido de cromo trivalente en contacto con los ambientes naturales y, iii) aunque en el ambiente el óxido de cromo trivalente no es termodinámicamente estable, éste reaccionará de manera extremadamente lenta. Sólo los estados de oxidación III y VI poseen importancia biológica, presentando efectos fundamentalmente distintos. El cromo trivalente es considerado un nutriente esencial para el hombre y otros animales y plantas, en cambio el cromo hexavalente es un xenobiótico, por lo cual su presencia en el ambiente es señal de actividad antrópica (IPCS, WHO, 1988).

En las aguas naturales el cromo puede ser encontrado básicamente en dos estados de oxidación: Cr(III) y Cr(VI). La presencia de una u otra forma o de la relación entre ellas dependerá de procesos ambientales (Especiación, Transporte, Transformación y Acumulación), siendo los más importantes, las transformaciones redox inducidas química y fotoquímicamente, la precipitación, la disolución, la adsorción y la desorción. Al respecto existe gran cantidad de trabajos publicados y esta información fue interpretada e integrada de manera resumida por Pedro Carriquiriborde en su trabajo de Tesis Doctoral (2004).

La reducción del cromo hexavalente ocurre espontáneamente dentro de los organismos y gradualmente cuando se encuentra en solución acuosa y entra en contacto con la materia orgánica. Por el contrario, se conocen muchos complejos y quelatos para el cromo trivalente, muchos de los cuales son muy estables en solución, lo que transforma a los compuestos trivalentes en compuestos relativamente inertes, debido a su estabilidad electroquímica. Su solubilidad en los fluidos biológicos está dada por determinados ligandos que se forman mediante reacciones bioquímicas específicas (Cotton y Wilkinson, 1966; Mertz, 1969).

En el presente trabajo de tesis se seleccionó al cromo hexavalente, obtenido por disolución de dicromato de potasio en agua de ensayo, como el tóxico referencia.

Si bien el cromo hexavalente no es un contaminante peligroso que constituya un problema para la sociedad actual, debido a sus propiedades fisicoquímicas y su distribución en el ambiente anteriormente detalladas, presenta efectos sobre los ecosistemas acuáticos y la salud humana (los mismos se detallan en el ítem 1.2 del Capítulo V). Metodológicamente, el cromo hexavalente obtenido a partir de dicromato de potasio en solución acuosa, debido a que es un patrón primario, resulta ser una fuente de Cr(VI) confiable y la preparación de soluciones acuosas de concentración conocida puede realizarse por pesada en balanza analítica y disolución en volúmenes conocidos.

Los cuatro motivos principales por los que se seleccionó al Cr(VI) como contaminante de referencia fueron:

- La sal dicromato de potasio a partir de la cual se preparan las soluciones es de fácil obtención y presenta precios accesibles.
- Las soluciones de dicromato de potasio en agua, incluso a bajas concentraciones, son muy estables, manteniendo constantes sus concentraciones a lo largo del tiempo.
- El lugar de trabajo propuesto cuenta con la infraestructura necesaria para analizar los niveles de concentración de cromo en agua, además de tener la metodología puesta a punto por personal técnico experimentado.
- Existe gran cantidad de publicaciones donde se evalúan los efectos del Cr(VI) en ensayos de laboratorio sobre diversos organismos de distintos niveles taxonómicos.

De lo enunciado se deduce que realizar ensayos con cromo es relativamente simple, de bajo costo, gran confiabilidad (al contar con la posibilidad de comprobar la calidad analítica de los resultados) y luego de interpretar los resultados es posible ponerlos en contexto, cruzándolos con información procedente de bases de datos existentes.

1.1.d Los bioensayos como herramienta para detectar la contaminación.

Al momento de detectar la presencia de tóxicos o contaminantes peligrosos, en algunas circunstancias no se cuenta con la infraestructura ni la experiencia necesaria para su detección, control y gestión. En general, los esfuerzos se centran en la evaluación de la carga orgánica y algunos parámetros físico-químicos, dejando de lado el riesgo que para la salud humana y de los ecosistemas constituye la presencia de sustancias tóxicas. Una de las opciones con que se cuenta para la detección de sustancias nocivas o peligrosas es la utilización de métodos biológicos, los que se comenzaron a utilizar tempranamente en el siglo veinte y se fueron perfeccionando hasta el día de hoy (Castillo Morales, 2004).

El concepto de bioensayo que deriva de la toxicología clásica ha sido modificado, adaptado y extendido al diagnóstico y manejo ambiental dentro del campo de la Ecotoxicología y junto a los análisis fisicoquímicos convencionales, los ensayos de toxicidad son considerados como una alternativa eficaz en la predicción de niveles de concentración seguros de compuestos tóxicos.

En algunas circunstancias estos ensayos son realizados solamente con una única especie, en una etapa de su ciclo de vida, frente a un solo compuesto puro bajo condiciones controladas de laboratorio, presentando sus resultados una relevancia ecológica limitada (Burkhart *et al.*, 2003). A pesar de las restricciones que impiden, a partir de la información proveniente de los bioensayos, realizar extrapolaciones a escala ambiental, son los resultados de este tipo de estudios, los que han venido siendo las fuentes de información predominantes, para la evaluación ecológica de los efectos de los contaminantes tóxicos (Ronco *et al.*, 2004).

En ciertas aplicaciones se requiere del uso de ensayos específicos para cubrir objetivos tales como la especiación química del contaminante en el ambiente, la cinética de los compuestos químicos y su interacción con el sedimento, y la acumulación por la cadena alimenticia. Los bioensayos también ofrecen un punto de comparación válido, al permitir confrontar la toxicidad relativa de determinadas sustancias químicas puras o sus mezclas, evaluando así el efecto o impacto de los agentes contaminantes sobre los *test organisms* (en adelante: organismos de prueba), teniendo en cuenta diferentes puntos finales, evaluando tanto efectos letales como subletales, que consideran, además de la supervivencia, aspectos vinculados con el normal crecimiento y desarrollo de los organismos de una población.

La información que se obtiene de la realización de este tipo de experimentos es fundamental para diseñar o programar futuros estudios con mayor relevancia Ambiental o Ecológica. La mayor compilación de datos de toxicidad existente en la actualidad ha sido generada durante las últimas décadas a partir del estudio de efectos biológicos con especies provenientes del hemisferio norte, y en su gran mayoría para especies de animales acuáticos. Existen hoy en día organismos que se encargan de la recopilación de información con relación al ensayo de sustancias nuevas USEPA, SETAC, Environmental Canada, y regularmente publican informes y reportes técnicos al respecto, como por ejemplo Schuytema y Nebeker (1996); Jarvinen y Ankley (1999); Pauli *et al.* (2000), respectivamente.

Sin embargo, no ocurre lo mismo con la información existente referente al estudio de efectos biológicos de contaminantes ambientales sobre especies de la región Neotropical. Se presume que aún no han sido descritas la totalidad de especies que habitan esta región y hoy día entre las descritas, existe muy poca información acerca de su biología. La investigación de estas especies, la descripción de su biología y la obtención de información toxicológica posee un gran interés para los científicos y evaluadores ambientales de la región (Ferrari *et al.*, 1997; Perez-Coll y Herkovits, 1999; Demichelis *et al.*, 2001; Ronco *et al.*,

2000; Natale *et al.*, 2000; de la Torre, 2001; Herkovits *et al.*, 2002; Carriquiriborde y Ronco, 2002; Bulus Rossini y Ronco, 2003; Sobrero *et al.*, 2004; Carriquiriborde, 2004, Ferrari *et al.*, 2005; Salibián, 2006), ya que sólo se podrá avanzar en el campo de la ecotoxicología a partir de los resultados obtenidos al desarrollar este tipo de líneas de investigación.

1.1.e ¿Qué especies utilizar a la hora de hacer ensayos?

Como mencionamos anteriormente, los ensayos de toxicidad en laboratorio son herramientas muy útiles en evaluaciones de calidad del agua y han sido ampliamente utilizados tanto por el sector público como el privado de gran parte del mundo en las dos últimas décadas. Este uso de los bioensayos justifica que puedan ser considerados como herramientas bioanalíticas, y se restringe a un reducido número de especies para las cuales se han desarrollado protocolos de laboratorio estandarizados por organismos internacionales tales como U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), American Society for Testing and Materials (ASTM), Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Environmental Canada, PNA, IRAM, AOAC, ISO, entre otros. Estos organismos de protección ambiental y de estandarización, han concentrado la elaboración de implementación de sistemas de diagnóstico, base para la generación de estrategias ecosistémicas de protección. Ello está orientado a la obtención de respuestas estandarizadas de laboratorio (bioensayos) que permitan asegurar dentro de un grado de confiabilidad, la medida obtenida (Ronco *et al.*, 2004). Según la USEPA (1989) las especies recomendadas para realizar ensayos de toxicidad aguda, fueron seleccionadas para representar una performance estándar o un indicador apropiado de sensibilidad de toxicidad para una categoría taxonómica dada (Heber *et al.*, 1996).

La aceptación de estos protocolos por parte de la comunidad científica y por los organismos de gobierno, permitió la realización de numerosas pruebas con una gran cantidad de productos industriales y sustancias químicas de distintos orígenes. El amplio número de publicaciones facilitó el establecimiento de niveles de sensibilidad de las especies ensayadas y una selección más rigurosa, al momento de evaluar la practicidad y factibilidad de estos ensayos. El ofrecer un producto minuciosamente elaborado, de fácil desarrollo y ampliamente utilizable, produjo un estancamiento en el desarrollo de nuevas metodologías. Si bien muchas de las especies utilizadas poseen una amplia distribución, existen escasos protocolos desarrollados para especies neotropicales y autóctonas de nuestro país. Ello plantea un problema a la hora de evaluar el impacto de una sustancia o mezcla sobre algún ecosistema acuático de esta región u otra región específica, lo cual constituye una variante de las aplicaciones de la realización de bioensayos de toxicidad.

La utilización de especies nativas diferentes a las recomendadas por los organismos mencionados debe estar avalada por información de la nueva especie diagnóstico propuesta, demostrando que la misma cumple con una serie de pautas o criterios importantes a considerar:

- Conocer los principales aspectos sobre la biología, ecología y fisiología de la especie elegida. Son preferibles aquellas que posean hábitos de vida relacionados con la problemática a evaluar, como así las que se reproduzcan en forma continua y que coloquen muchos huevos, lo que facilitará la obtención de éstos durante todo el año. También son preferibles las especies que posean ciclos de vida cortos y dimensiones manejables, de tamaño reducido, para facilitar un mayor número de datos.
- Conocer el grado de dificultad o la facilidad para la obtención de adultos reproductores y puestas en campo. Son preferibles las especies con alta disponibilidad y abundancia.
- Conocer la factibilidad y disponibilidad de métodos de reproducción y cría en laboratorio. Son preferibles aquellas especies fáciles de criar y reproducir.
- Conocer la tolerancia al manejo en condiciones de laboratorio y las respuestas a lo largo del ciclo de vida (sin que se produzcan cambios importantes en los organismos durante su ciclo de vida, permitiendo realizar un eficaz cultivo, crecimiento, manutención y ensayo bajo condiciones controladas de laboratorio). Son preferibles las especies que necesiten un mantenimiento sencillo y no sean afectadas por el manejo en laboratorio a lo largo del ciclo de vida.
- Conocer su susceptibilidad a enfermedades y parásitos.
- Conocer la sensibilidad de la especie a sustancias tóxicas que suelen estar presentes en los vuelcos y a compuestos patrones de referencia ampliamente usados en estudios de toxicología clásica. Son preferibles las especies más sensibles a estas sustancias y aquellas que mantengan una sensibilidad estable (constante) en el tiempo.
- Conocer la relación filogenética y ecológica, además de otras similitudes con las especies recomendadas por la US EPA y los otros organismos oficiales. Por una cuestión comparativa, es preferible que las especies elegidas estén relacionadas con las especies propuestas como parámetros estándar.
- Considerar la importancia ecológica, económica y recreacional. Son preferibles las especies importantes para la comunidad, en estos sentidos.
- Finalmente, conocer la relación del Hombre con esta especie, ya sea por medio de la cadena trófica o por su parentesco o relación filogenética, lo que permitiría evaluar el grado de riesgo de la salud humana en relación con lo que le pase a estos animales en su medio natural. Se preferirán especies mas emparentadas con el ser humano y especies cuyo rol ecológico presente una relación directa con las actividades del hombre y la salud humana.

1.1.f El estudio de los vertebrados en ecotoxicología

El interés por el estudio de los vertebrados en ecotoxicología, reside en la cercanía filogenética que presentan con el hombre, contemplando que las extrapolaciones empleadas en cuestiones de salud humana poseen un mayor realismo a medida que las relaciones de parentesco son más cercanas. También ciertos aspectos de conservación de fauna están más asociados con las especies de vertebrados, ya que éstas poseen un mayor valor económico o de mayor impacto para la sociedad. Sparling *et al.* (2000) realizaron una investigación sobre los trabajos publicados entre 1972 y 1998, en las bases de datos de *Wildlife Review and Sport Fisheries*, relacionados con ecotoxicología en vertebrados. Encontraron que en este periodo se publicaron un total de 12.727 títulos; de éstos el 28,6% fueron hechos con peces, el 29,9% con aves, el 13% con mamíferos y el 3,5% con anfibios y reptiles. Los mismos autores destacan la necesidad de realizar estudios con la Herpetofauna y comentan que de las investigaciones realizadas acerca de los distintos efectos de tóxicos sobre diferentes clases de vertebrados, sólo un 2,7 % están relacionadas con anfibios, y de este porcentaje sólo el 24,8% estudia la toxicidad de los metales. Al examinar lo antedicho, queda explícita la importancia de cubrir con estudios de base estos huecos de información existentes en la literatura ecotoxicológica de vertebrados.

1.1.g Los anfibios anuros en el contexto de la investigación

Los anfibios anuros son los vertebrados más avanzados que conservan larvas de vida libre. La existencia de un ciclo de vida bifásico (con larvas acuáticas que sufren metamorfosis para originar un organismo terrestre), sumado a que sus huevos no tienen cáscara, genera en muchos casos una ontogenia expuesta que facilita el análisis de su desarrollo en comparación con otros grupos de tetrápodos. Siendo vertebrados ectotérmicos, la actividad de los anuros está estrechamente relacionada con las variables físicas de los ambientes acuático y terrestre. Su piel es un órgano complejo que constituye la ruta principal de intercambio de gases para la respiración, agua e iones; quedando particularmente expuestos a la acción de tóxicos. No emigran del sitio en el cual eclosionan (completando su ciclo de vida en ese mismo lugar), lo cual los hace excelentes indicadores y registros de las condiciones locales. Si además tenemos en cuenta la gran diversidad morfológica que presentan y su presencia en la mayor parte de los ecosistemas, abarcando también una gran cantidad de hábitats, podemos concluir que son varias las razones por las que los anfibios pueden ser considerados a la hora de seleccionar organismos de referencia para la realización de estudios de impacto ambiental, o de efectos de los contaminantes sobre poblaciones naturales, o simplemente como posibles indicadores de la calidad del ambiente.

En general se cuenta con poca información precisa acerca de la biología de las especies de anuros disponible a la hora de realizar diseños experimentales que comprometan a las larvas, particularmente en los aspectos relacionados con sus densidades, alimentación y condiciones de cría. He aquí los fundamentos por los que el presente trabajo de tesis dedica parte del Capítulo III a la descripción de la biología de las distintas especies de la comunidad investigada

(Ítem 4 del Capítulo III), detallando los estudios de monitoreo y observación en campo (ítem 4.a del Capítulo III), los estudios bioecológicos realizados con larvas en condiciones controladas de laboratorio (ítem 4.b del Capítulo III) y un ítem final (ítem 4.c del Capítulo III) en el que, a modo de conclusión, se vuelcan los conocimientos adquiridos, tanto en campo como en laboratorio, realizando una descripción de la biología de las especies estudiadas.

1.1.h Las larvas de anuros como sistema de estudio

Las efímeras, comedoras y no reproductivas larvas del ciclo de vida de los anuros, conocidas por sus nombres convencionales en diferentes partes del mundo como: *têtard* (Francia), *tadpole* (Estados Unidos), *kaulquappen* (Alemania), *girino* (Italia), *ketou* (China), *renacuajo* (Argentina, Uruguay y México), además de otros nombres regionales como *gusarapo* (Argentina) y *bunbulun* (Honduras), constituyen uno de los atractivos naturales más comunes y sorprendentes de nuestras infancias. Son muchos los biólogos que en su infancia se han asombrado al observar cómo un renacuajo, que vivía en un frasco o pecera improvisada, derivaba en una rana o sapo delante de sus ojos de manera simple y natural, como si eso no mereciera ningún tipo de cuestionamiento. Los primeros investigadores de Europa y Norte América apreciaron a los renacuajos como formas típicas, monótonamente similares y difícilmente distinguibles, lo que concluyó en que fueran ignorados por muchos herpetólogos. Las colecciones no los consideraron por mucho tiempo y la ausencia de claves para identificar renacuajos conllevó aumentar esta brecha de desconocimiento. El ciclo de vida complejo de los anfibios, particularmente de las ranas, que permite ocupar escenarios ecológicos totalmente diferentes, y la interacción evolutiva entre estos dos estados, provee una situación única entre los tetrápodos. El pequeño tamaño, su abundancia general, su baja posición en la cadena trófica, su relativa corta vida, la ausencia de comportamiento reproductivo y la facilidad de mantener y criar renacuajos en cautiverio, hacen de éstos excelentes objetos de estudio para investigar la naturaleza de muchos procesos biológicos complejos y sus interacciones McDiarmid y Altig (1999).

Los estudios de larvas de anuros han contribuido inmensamente en diversas áreas de la investigación biológica, y los renacuajos han sido los primeros sujetos en definir principios generales así como la naturaleza de interacciones que operan a distintos niveles ecológicos (individuos, poblaciones y comunidades). Luego de los primeros trabajos sobre el ciclo de vida de los anfibios, publicados entre 1550 y 1750, la mayor parte de los zoólogos entendían que los renacuajos eran estadios tempranos de las ranas. Sólo una discusión planteada por Hutchinson en 1796, rompió momentáneamente este consenso, al intentar demostrar que los renacuajos eran peces, a partir de observaciones realizadas sobre el renacuajo de *Pseudis paradoxa*. Sin embargo, los trabajos publicados durante 1800, principalmente sobre anatomía de larvas de diferentes especies, clarificaron y expandieron los conocimientos sobre las características larvales. Durante el 1900, además de seguir expandiendo la literatura sobre anatomía larval y descripciones varias, las discusiones se focalizaron en las relaciones filogenéticas entre las larvas y sobre las características que marcaban estas relaciones

Con el aumento de los conocimientos acerca de los renacuajos, otros investigadores comenzaron a focalizar su atención sobre diferentes aspectos de la biología y de la morfología larval (Wasseburg, a partir de 1970; Wassersug, 1971), de la natación (Wassersug y Hoof, 1985), de la ecología alimentaria (Lanoo *et al.*, 1987) de las estructuras y dinámicas de las comunidades de larvas (Wilbur, 1972) y de los aspectos ecológicos de la metamorfosis (Wilbur y Collins 1973). Así, se llegó a tener un grado de comprensión integral sobre la ecología de los renacuajos, su dinámica, evolución y estructura. (Ver Figura 2, página siguiente)¹.

Sin embargo, podríamos decir aquí que fue recién en la década del '60 cuando se comenzó a modelizar la ecología de las larvas y se las propuso como organismo de referencia para estudios de procesos ecológicos. Particularmente, la rápida expansión de la literatura de los renacuajos durante la década del '80 deriva de la discusión de un conjunto de hipótesis generadas en los trabajos de Wilbur y Collins (1973), Wilbur (1980), Travis (1984) y Seale (1987), que fueron contrastadas en muchos trabajos publicados a lo largo de esta década. Ya en la última década y con muchos trabajos publicados sobre varios aspectos de la biología de los renacuajos, se publica el libro "*Tadpoles: the biology of anuran larvae*". Este libro resume la información publicada hasta 1997, ordenando y mostrando el estado actual del conocimiento sobre larvas de anuros, además de dar las herramientas básicas consensuadas para encarar estudios de larvas con metodologías normalizadas en las distintas líneas de investigación.

A pesar del grado de avance logrado en la investigación sobre la biología de los renacuajos, hoy día existen muchas especies de las que se desconoce su larva, y hay otras cuya morfología apenas se encuentra descripta, ignorándose aspectos generales de la biología y ecología. Al llegar a este punto se podría decir, que al igual que en otras tantas disciplinas, el mencionado desarrollo en la investigación se encuentra asociado a estudios realizados en el hemisferio norte, que razonablemente emplean especies de la región.

De aquí se deduce que son relativamente pocas las investigaciones sobre larvas de anuros en América del Sur. Particularmente en Argentina, las investigaciones relacionadas con este tema fueron abordadas tempranamente por Fernández y Fernández (1921), Scott-Birabén y Fernández-Marcinowski (1921), Fernández (1926), quienes describieron morfologías, variaciones de caracteres y ecología de muchas larvas de Argentina. Estas líneas de trabajos fueron continuadas con contribuciones de Bokerman (1963); Cei (1980,1987), Duellman (1978); Etcheverría *et al.* (1987); Formas y Pugín (1978), Heyer *et al.* (1990); Izecksohn *et al.* (1979), Lavilla (1984); Lescure (1981); Peixoto (1982), entre otros.

No obstante, los estudios realizados sobre ecología de larvas de especies argentinas quedan restringidos a los trabajos sobre algunas pocas especies. El

¹ Corresponde a la Figura 10.1 del Capítulo 10 de Ecology: Resource Use, Competition, and Predation (Alford, 1999).

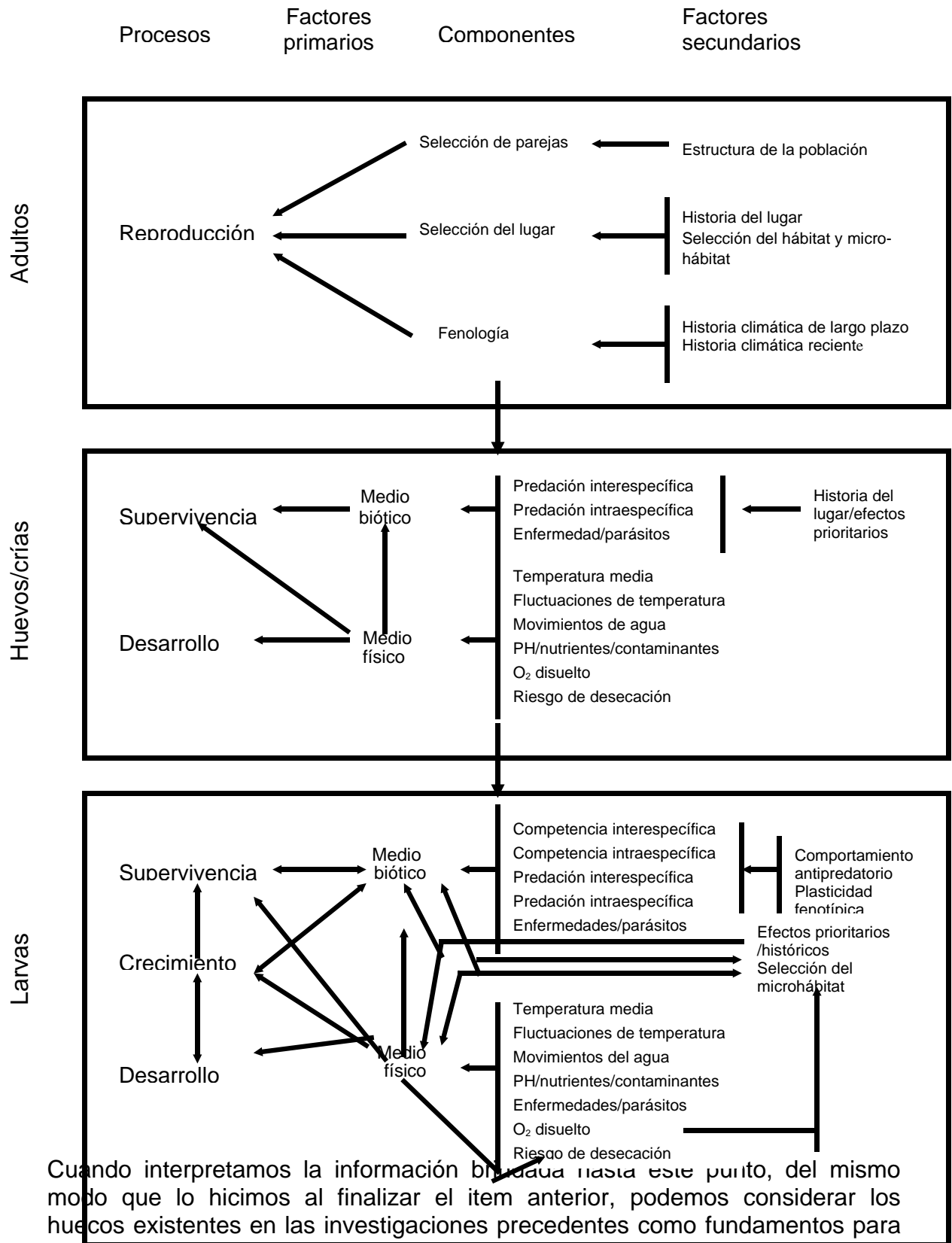
pionero en trabajos de Ecología experimental en nuestro país fue Kehr (Kehr, 1985, 1987, 1989, 1991, 1992, 1994; Kehr *et al.*, 1984, 1990a-b, 1992; Basso y Kehr, 1992), quien marcó el rumbo a posteriores estudios, incluido este trabajo de tesis. Si bien actualmente se siguen desarrollando investigaciones que intentan conocer los factores que afectan el normal desarrollo de las larvas de anuros, los trabajos actuales de ecología experimental con larvas de anfibios están orientados a estudios aplicados, como son la influencia de contaminantes y de radiación ultravioleta. Estos últimos dos factores, cuyas magnitudes han sido modificadas, producto de la actividad humana en las últimas décadas, son considerados como posibles causantes del proceso de disminución numérica de poblaciones mundiales de anfibios del mundo denominado “declinio global de anfibios”, junto a los factores bióticos o enfermedades (Ver más adelante ítem 1.1.i).

Los trabajos realizados en campo y laboratorio por Arturo I. Kehr con larvas de especies autóctonas, además de las recomendaciones brindadas en distintas oportunidades, hicieron posible abordar el problema del impacto de la contaminación en larvas de anuros, ya que ofrecieron una sólida base para comenzar y utilizar estos estudios como modelo para otras especies a estudiar.

El efecto de contaminantes sobre embriones y larvas de anuros en la Argentina tiene su base en numerosos estudios realizados sobre la mecánica del desarrollo en vertebrados a partir de la década del 40' por Armando Pisano y colaboradores. (Pisano, 1939). El Dr. Pisano años más tarde incursionó en la línea de investigación de Embriología y Fisiología experimental de anfibios, línea de investigación en la que desarrolló sus estudios Alfredo Salibián² a partir de la década del '70 (Salibián, 1970). El Dr. Salibián llevo a cabo un gran número de estudios pioneros en el área de la toxicología acuática con especies de anuros autóctonos, guiando en el transcurso de sus trabajos a muchos investigadores, entre los que se encontraron Cristina Pérez-Coll, Lucrecia Ferrari y Jorge Herkovits (Perez-Coll y Herkovits, 1999; Herkovits *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2005), quienes continuaron desarrollando esta línea de trabajo hasta la actualidad. Estos autores estudiaron los efectos de los contaminantes sobre larvas de anuros siguiendo las pautas de la toxicología tradicional, realizando sus estudios principalmente con una especie autóctona, *Bufo arenarum*, y en ocasiones con especies exóticas como *Rana catesbeiana* y *Xenopus laevis*. Años más tarde, y siguiendo los lineamientos de estos grupos de investigadores, surgió una nueva generación de investigadores entre los que podemos mencionar a Rafael Lajmanovich (Lajmanovich, 2002, 2003), Fernando de la Torre (de la Torre, 2004) y Gabriela Perotti (Perotti, 2005) que comenzaron a realizar estudios aplicados, contemplando los posibles factores que actúan sobre el declinio de anfibios, integrando información de las distintas ramas antes mencionadas, lineamiento incorporado en el presente trabajo de Tesis Doctoral.

² El Dr. Salibián investigó profundamente aspectos vinculados con la embriología, fisiología y toxicología de *Bufo arenarum* principalmente, además de otras especies de anuros.

Figura 2 Resumen comparativo de los factores que afectan la ecología de los embriones, larvas y adultos



Cuando interpretamos la información bruta hasta este punto, del mismo modo que lo hicimos al finalizar el ítem anterior, podemos considerar los huecos existentes en las investigaciones precedentes como fundamentos para dedicar el Capítulo III a la descripción de la biología de las distintas especies de la comunidad investigada (ítem 4), detallando los estudios de monitoreo y observación en campo (ítem 4.a), los estudios bioecológicos realizados con

larvas en condiciones controladas de laboratorio (ítem 4.b) y un ítem final (ítem 4.c) en el que, a modo de conclusión, se vuelcan los conocimientos adquiridos, tanto en campo como en laboratorio, realizando una descripción de la biología de las especies estudiadas.

1.1.i Estudio de los efectos del cromo sobre anfibios

Como mencionamos anteriormente, entre las investigaciones realizadas acerca de los distintos efectos de tóxicos sobre diferentes clases de vertebrados, sólo un 2,7% están relacionadas con anfibios, y de este porcentaje sólo el 14,8% trata de la toxicidad de los metales. El efecto del Cr(VI) en anfibios ha sido poco caracterizado, y la mayoría de los experimentos realizados han contemplado bioensayos en condiciones de laboratorio, exponiendo a embriones o larvas de anfibios a distintas concentraciones del contaminante durante un período corto de su fase de vida acuática. Sólo un pequeño número de ensayos realizados con este metal está disponible en la literatura (Linder y Grillitsch, 2000) y los diferentes parámetros toxicológicos estimados (LC's, NOEC, LOEC) varían ampliamente, siendo hasta el momento los embriones de *Gastrophryne carolinensis* (Birge, 1978), los más sensibles de todas las especies estudiadas hasta el momento. Los resultados obtenidos a partir de la búsqueda bibliográfica se presentan en la Tabla 2. También se conocen algunos aspectos de su bioacumulación en estudios de campo (Burger, 1998). Los distintos trabajos indican que las concentraciones letales efectivas, generalmente exceden 1 mg Cr/l (Linder y Grillitsch, 2000), mientras que otros trabajos sólo encontraron inhibición del crecimiento y desarrollo e inducción de teratogénesis a concentraciones subletales cercanas 0,5 mg Cr/l. (Slooff y Canton, 1983; Abbasi y Soni, 1984).

Tabla 2 Datos de toxicidad aguda de cromo, expresados como LC50_{96h} (mg Cr(VI)/L), para diferentes especies de anuros

Especie	LC50 _{96h}	Referencia
<i>Gastrophryne carolinensis</i>	0,03	Birge <i>et al.</i> , 1978
<i>Rana pipiens</i>	0,08	Birge <i>et al.</i> , 2000
<i>Bufo fowleri</i>	0,11	Birge <i>et al.</i> , 2000
<i>Rana tigrina</i>	2,00	Abbasi y Soni, 1984
<i>Ambistoma opacum</i>	2,13	Birge <i>et al.</i> , 1978
<i>Scinax squaleirostris</i>	4,05	Natale <i>et al.</i> , 2000
<i>Dendropsophus nanus</i>	10,48	Natale <i>et al.</i> , 2000
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	16,26	Natale <i>et al.</i> , 2000
<i>Bufo melanostictus</i>	49,29	Khangarot y Ray, 1987
<i>Rana hexadactyla</i>	100,00	Khangarot <i>et al.</i> , 1985

Desde el inicio de esta investigación se realizaron distintas contribuciones acerca del efecto del Cr(VI) sobre larvas de anuros de especies autóctonas. Las mismas, publicadas oportunamente, han sido incorporadas a este trabajo y serán presentadas como parte de la tesis, en los resultados, conclusiones y discusión del Capítulo IV.

Si se realizaran comparaciones de los efectos de una sustancia sobre la fase larval de los anuros, o se intentara establecer alguna escala de sensibilidad con la información existente en la literatura al comienzo de esta investigación, nos encontraríamos con que la existencia de diferencias entre las especies químicas estudiadas y la variabilidad metodológica en los diseños experimentales utilizados, no permiten concretar comparaciones válidas, ni lograr interpretaciones inequívocas al respecto. Esto nos podría indicar que existe una falta de consenso en cuanto a las metodologías de laboratorio, a la hora de considerar a los bioensayos de toxicidad como una herramienta bioanalítica estandarizada. Este hecho constituye otro de los huecos de información existentes en la literatura científica que dieron sustento a la realización del presente trabajo de tesis.

De ello se deduce que si nuestro objetivo es utilizar los bioensayos de toxicidad como herramienta bioanalítica, las variaciones en cuanto a la metodología serían desventajas evidentes. Sin embargo, estas mismas variaciones encuentran su justificación en otro uso de los bioensayos, cuando por medio de estos se trata de interpretar procesos complejos que ocurren en ecosistemas particulares, como es el caso de ecosistemas autóctonos de cualquier parte del mundo.

En estos casos, el diseño de las investigaciones, si bien considera las metodologías existentes, requiere necesariamente un proceso de adaptación o adecuación al caso de estudio por cuestiones de representatividad. Es en este punto donde las metodologías particulares adquieren una importancia singular y se alejan de la condición de comparables y normalizadas (condición necesaria para su uso como herramienta bioanalítica).

Consideramos adecuado resaltar en este punto que al momento de iniciación de este trabajo de tesis no se conocían estudios en renacuajos con Cromo(VI) que intentaran responder las preguntas de investigación o contrastar las hipótesis planteadas aquí.

1.1.j Aportes a la justificación del problema de la disminución numérica de poblaciones de anfibios en el mundo

Introducción teórica a la problemática de la disminución

Durante el primer Congreso Mundial de Herpetología, realizado en Canterbury, Inglaterra, en 1989, quedó claro que algunas poblaciones de anfibios, sin causas entonces evidentes, mostraban reducciones numéricas drásticas. A partir de ese momento, herpetólogos de distintos lugares del mundo continuaron registrando disminuciones numéricas evidentes en numerosas poblaciones de diferentes especies de anfibios (Barinaga, 1990; Pechmann *et al.*, 1991; Wake, 1991; Blaustein, 1994; Pechmann y Wilbur, 1994; Blaustein y Wake, 1995; Beebe, 1995; Duellman, 1995; Stebbins y Cohen, 1995; Lips, 1999; Lips *et al.*, 1999; Linder *et al.*, 2003; Blaustein, 2001; Pechmann y Wake, 2004). Aparentemente, este proceso denominado “declinación global de anfibios” es un fenómeno creciente y sus causas son actualmente desconocidas. Si bien son varias las hipótesis enunciadas acerca de los múltiples

factores que influyen en este proceso, la degradación del medio ambiente (particularmente la contaminación por sustancias químicas de los ecosistemas acuáticos) parece ser una de las explicaciones más plausibles a este fenómeno.

Antecedentes en Latinoamérica

Lips *et al.*, (1998, 2000, 2001) realizaron estudios prolongados en la región sur y central de Costa Rica de donde se obtuvo información relevante para la comprensión de la declinación. Entre otras cosas observaron: individuos muertos y moribundos, cambios en las proporciones de sexos y que las especies más afectadas eran las que se encontraban en relación estrecha con ambientes acuáticos (aquellas que poseían huevos y larvas acuáticas). Concluyeron entonces que la contaminación del medio ambiente, ya sea de origen patogénico, químico o una combinación de ambos, junto a cambios climáticos, podría ser la causa de la disminución de anfibios, al menos en esa zona de estudio.

Antecedentes en Argentina

La información disponible sobre el estado de conservación de la batracofauna argentina ha sido sintetizada en primer lugar por Ubeda *et al.*, (1994), poniendo de manifiesto la escasez de información disponible y la sospecha de que la batracofauna nacional no se encuentra ajena al problema de la declinación global. Más recientemente Lavilla *et al.*, (2000), establecieron que de las 172 especies y subespecies de la Argentina, 2 se encuentran en peligro de extinción, 50 son vulnerables y es poco o nada lo que se sabe de 37 de las mismas. Las 81 formas restantes se consideran como no amenazadas. Este último autor (Lavilla, 2001), clasifica las causas que han sido propuestas como las principales para la declinación global de los anfibios, sobre la base de las evidencias directas e indirectas disponibles para la República Argentina en 7 categorías: 1) Pérdida de hábitats por alteración irreversible y/o fragmentación. 2) Alteración de hábitats por contaminación química y orgánica. 3) Introducción de especies exóticas. 4) Enfermedades. 5) Aumento de la radiación ultravioleta. 6) Cambio climático global. 7) Comercio de especies. Se aporta con esta clasificación una perspectiva más definida en cuanto a los posibles factores de riesgo que podrían provocar las disminuciones numéricas en las poblaciones de anuros de nuestro país.

Si bien estas categorías constituyen líneas de investigación procedentes de diversas ramas de la ciencia, hacia fines de los noventa no habían sido abordadas respecto de los anfibios de Argentina, por lo que constituyeron otro de los huecos de información que justificó el lineamiento del presente trabajo de tesis. A partir de la última década en nuestro país se ha comenzado a abordar esta problemática, realizándose distintos aportes en las distintas categorías antes enumeradas: Categoría 1 (Peltzer *et al.*, 2003, 2004), Categoría 2 (Salibián 1992, 1993; Ferrari 1993, 1997, 1998; Demichelis, 2001; Lajmanovich *et al.*, 2002, 2003; Ferrari, 2005), Categoría 3 (Sanabria, 2004), Categoría 4 (Herrera *et al.*, 2005), Categoría 5 (Perrotti, 2005).

El presente trabajo propone entre sus objetivos realizar aportes a la justificación problema de la disminución global de anfibios desde el punto de vista de la contaminación, abordando la problemática mediante un enfoque ecotoxicológico, que interpreta una comunidad representativa de la biodiversidad presente en la región.

1.2 Problema de investigación e hipótesis

Si bien el marco de referencia para el problema de investigación se ha venido desarrollando en el ítem 1 de este Capítulo, y en el Capítulo II se desarrollarán con profundidad los Objetivos y las Hipótesis del presente trabajo de tesis, en los párrafos siguientes se intenta resumir este marco y algunas de las hipótesis generales, con la intención de reflejar anticipadamente la intención del mismo.

El presente trabajo de tesis aporta información relacionada con aspectos básicos del conocimiento sobre la biología de 16 especies de anuros autóctonos. Particularmente describe aspectos básicos de su biología reproductiva, modo de reproducción, desarrollo en su fase de vida acuática, describiendo distintos aspectos de su mantenimiento en cautiverio, condiciones de cría, tasas de desarrollo, crecimiento y supervivencia en laboratorio. Por otra parte, evalúa la factibilidad de realizar ensayos de toxicidad aguda y crónica con las larvas de estas especies. Propone una metodología de ensayo que permita realizar comparaciones de sensibilidad entre las especies de la comunidad de anuros estudiada y de éstas con otras especies. Realiza una contribución al estudio de los efectos de la contaminación ambiental, particularmente la contaminación química por metales pesados, y sus efectos sobre las poblaciones de anuros, considerando a un contaminante patrón: el Cromo (VI), como representante de la contaminación química por metales pesados y a las larvas de anuros, como sistema de estudio. Cabe destacar aquí uno de los supuestos de la investigación: La fase de vida acuática es la etapa más vulnerable a la contaminación química, en el transcurso del ciclo de vida de los anuros.

Como resultado de este estudio se esperará obtener una línea base de conocimiento, útil para poder profundizar en la investigación de la sensibilidad de los anuros autóctonos a la contaminación, su posible uso como herramienta bioanalítica y su posible uso como indicador de contaminación. Además se intentará contribuir con información precisa sobre uno de los factores que actualmente están propuestos como causantes de la disminución numérica de las poblaciones de anuros en el mundo.

Se describen a continuación las hipótesis generales que promovieron el desarrollo de esta investigación; las mismas se detallan y profundizan en el Capítulo II de modo integral y luego en cada capítulo se describen las preguntas de investigación que generaron las distintas hipótesis, detallándose además las hipótesis y objetivos particulares de cada una de ellas.

Hipótesis Generales del Trabajo de Tesis:

- **H1:** Las especies de anuros estudiadas son organismos adecuados para la realización de bioensayos en laboratorio.
- **H2:** La contaminación por cromo afecta la fase de vida acuática de los anuros estudiados.
- **H3:** El cromo hexavalente a bajas concentraciones es tóxico para las larvas de anuros estudiadas.
- **H4:** Existe un incremento de efectos perjudiciales, producidos por el Cr(VI) que se correlacionan positivamente con el aumento de la concentración del tóxico en el agua.
- **H5:** Los renacuajos disminuyen su sensibilidad al Cr(VI) a medida que aumentan su edad.
- **H6:** Los renacuajos disminuyen su sensibilidad al Cr(VI) a medida que aumentan su tamaño.
- **H7:** Los renacuajos disminuyen su sensibilidad al Cr(VI) a medida que aumentan el estadio de desarrollo
- **H8:** La exposición a Cr(VI) a concentraciones constantes tiene mayores efectos a medida que se aumenta el tiempo de exposición al que son sometidos los renacuajos.
- **H9:** Existen diferencias en cuanto a la sensibilidad que presentan las larvas de las diferentes especies de una misma comunidad al Cr(VI).
- **H10:** La realización de ensayos de toxicidad aguda sobre las fases de vida inicial de las distintas especies de una comunidad permite determinar una clasificación de sensibilidad de estas especies.
- **H11:** Existe una relación entre el hábito de vida de los adultos y la sensibilidad al Cr(VI) en bioensayos de toxicidad aguda con larvas en STD 25.
- **H12:** Se puede emplear la información biológica y ecotoxicológica obtenida en estudios de laboratorio para detectar impactos en campo.
- **H13:** El estudio de la respuesta letal y subletal a contaminantes químicos (cromo) sobre comunidades de anfibios anuros con bioensayos de toxicidad de laboratorio, junto al conocimiento de la biología de las mismas, permite predecir riesgos potenciales de estos contaminantes sobre ecosistemas acuáticos naturales y modificados.
- **H14:** La sensibilidad de las especies y su posibilidad de exposición que conlleva su posible muerte o extinción están asociadas con su estrategia reproductiva.

1.3 Justificación de la investigación

En las distintas partes de la introducción se realiza una descripción de los diferentes campos, tanto teóricos como prácticos, que dan el marco contextual a la investigación, donde se incorporó la revisión de la literatura temática. Si consideramos su desarrollo, nos encontramos con la existencia de huecos de información que denotan la importancia de generar conocimientos en las diferentes áreas, además de visualizar el estado de conocimiento actual en las mismas y cuáles fueron las omisiones preexistentes de los investigadores que las desarrollaron, en cuanto a las metodologías y al problema de la investigación en sí. Al finalizar su lectura, parecen obvias las preguntas de investigación que surgen de este contexto, promoviendo el enunciado de las hipótesis generales del presente Trabajo de Tesis. Sin embargo, enumeraremos aquí de manera resumida las razones que justificaron esta investigación.

- No hay información sobre los anuros de la región Neotropical, particularmente sobre la biología reproductiva y el desarrollo de larvas de anuros argentinos.
- Al comienzo de esta investigación, no existía información básica acerca de la biología de las especies elegidas ni de cómo se comportan éstas en el manejo de laboratorio.
- El estudio Ecotoxicológico de los anuros de Argentina se ve limitado sólo a unas pocas especies y los efectos de sólo pocos contaminantes.
- Dentro de los vertebrados existe poca información relacionada con los anfibios y dentro de éstos sólo una pequeña porción se refiere a la toxicidad de metales sobre anuros.
- Faltan metodologías estandarizadas que permitan la comparación de resultados de los pocos estudios realizados con metales en larvas.
- Falta conocimiento sobre el efecto del Cromo (VI); no existe al día de hoy un consenso en cuanto a su modo de acción toxicocinética y toxicodinámica y sus efectos sobre larvas de anuros autóctonos.
- Si bien se encuentran identificados los factores que actúan negativamente sobre el bienestar de las poblaciones de anuros, es poco lo que se sabe acerca del estado de las poblaciones de anuros de Argentina y de su posible disminución numérica.
- No existen estudios que comparen la sensibilidad de distintas especies de una comunidad con una misma metodología que permita la comparación con datos existentes en la literatura.
- No se conocen estudios en renacuajos con Cromo (VI) que:

- Respondan las preguntas, o contrasten las hipótesis planteadas en esta tesis.
- Integren la información proveniente de la ecología y toxicología de larvas de anuros de una misma comunidad.
- Realicen un análisis comparativo de su sensibilidad.
- Evalúen la factibilidad de que los anuros sean utilizados como organismos diagnóstico en bioensayos de toxicidad en laboratorio.
- Adviertan el riesgo que produciría la contaminación en una comunidad de anuros de la región pampeana.

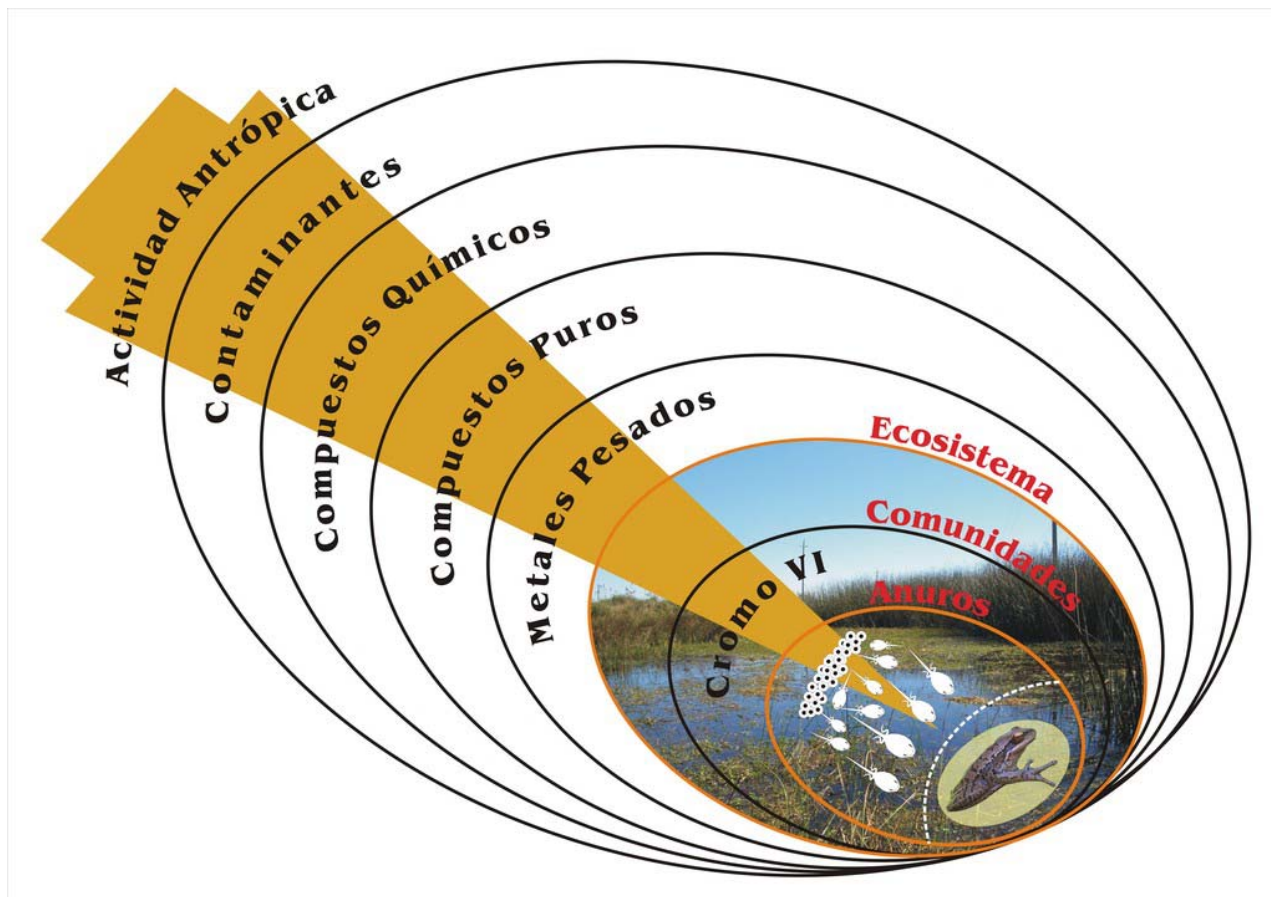
De acuerdo a lo anteriormente señalado, y teniendo en cuenta que la fauna de anuros que habita la zona de estudio posee gran variedad de estrategias adaptativas (Basso, 1990), y está representada por organismos con larvas acuáticas de varios tipos eco-morfológicos (Lavilla y Rougés, 1992) y adultos de hábitos estrictamente acuáticos (*Pseudinae*), semiacuáticos (*Leptodactylidae*), terrestres (*Bufonidae*) y arbóreos (*Hylinae*) de variados morfotipos y tamaños, es de especial interés la realización de estudios ecotoxicológicos y de evaluación de riesgo que incluyan estas formas. También es importante considerar que los estudios ecotoxicológicos sean interpretados con referencia a comunidades naturales, representativas de la biodiversidad presente en la región, con el fin de poder aportar información relevante para el conocimiento de las causales de su disminución numérica o riesgo de extinción de especies.

Este enfoque brindará información complementaria a los tradicionales estudios provenientes de la toxicología acuática, realizados a partir de ensayos de laboratorio escogiéndose una o unas pocas especies, sin un análisis de su relevancia en la estructuración de la comunidad a la cual pertenecen. Se intenta realizar aportes concretos sobre los efectos que el Cromo (VI) provoca sobre distintas especies de anuros y cubrir los huecos mencionados en la introducción.

1.4 Esquema de la tesis

Como se muestra en la Figura 3, el modelo de investigación propuesto plantea un sistema de estudio en el cual se analizará de manera general, el impacto que las actividades humanas tienen sobre la biosfera o “la naturaleza” (conjunto, orden y disposición de todo lo que compone el universo). Esta relación causa efecto se mantiene, disminuyéndose la escala del sistema hacia un subsistema de estudio, abordable y medible. Este subsistema posee como integrantes, por un lado, la contaminación química de origen antrópico que se introduce en los sistemas naturales como factor de impacto, siendo el cromo hexavalente el componente representativo, y por otro lado las larvas de las distintas especies de anuros que habitan las charcas seleccionadas como representantes del componente de la biota, uno de los compartimentos del ecosistema seleccionado, el que formaría parte de un sistema mayor, la biosfera ó “la naturaleza”.

Figura 3 Esquema de la Tesis



CAPITULO II

Planteo de hipótesis y objetivos

1 INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se detallan en profundidad las preguntas de investigación, las hipótesis y los objetivos de la tesis. En el ítem 2 se presenta un listado de las preguntas de investigación que guiaron el desarrollo de la misma, las cuales están agrupadas bajo subtítulos que distinguen áreas temáticas. Cada una de estas preguntas genera o bien una hipótesis de trabajo, en caso de ser enunciada *a priori* por el investigador como una afirmación, o constituye un objetivo de la investigación en el caso que el investigador *a priori* no emita ningún juicio acerca del posible resultado.

Las preguntas que generan hipótesis contrastadas en la literatura, serán mencionadas como hipótesis auxiliares (ítem 3). Las preguntas teóricas que no fueron abordadas detalladamente en la literatura y que no son contrastadas en el presente trabajo de tesis, pero constituyen un paso previo en la investigación, serán asumidas como supuestos (ítem 4).

En el ítem 5 se enuncian las hipótesis de trabajo de la tesis y sus correspondientes predicciones. En el ítem 6 se plantean los objetivos del presente trabajo. Luego, en cada capítulo, se detalla la lista de hipótesis, predicciones y objetivos planteados que forman parte del eje de los experimentos que se desarrollan en el mismo de manera específica.

2 LISTADO DE PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

ECOTOXICOLOGÍA

- ¿Las especies de anuros estudiadas son organismos adecuados para la realización de bioensayos en laboratorio?
- ¿La contaminación por cromo afecta la fase de vida acuática de los anuros estudiados?
- ¿Cuáles son los efectos que provoca la exposición aguda de renacuajos a Cr(VI)?

- ¿Cuales son los efectos que provoca la exposición crónica de renacuajos a Cr(VI)?
- ¿A qué concentraciones el cromo hexavalente es tóxico para las larvas de anuros estudiadas?
- ¿Existe una correlación positiva entre la concentración de cromo en el agua y los efectos perjudiciales que éste produce sobre los renacuajos?
- ¿A qué concentraciones el cromo hexavalente es letal para las larvas de anuros estudiadas?
- ¿Los renacuajos disminuyen su sensibilidad al Cr(VI) a medida que aumentan su estadio de desarrollo (STD)?
- ¿Los renacuajos disminuyen su sensibilidad al Cr(VI) a medida que aumentan su edad?
- ¿Los renacuajos disminuyen su sensibilidad al Cr(VI) a medida que aumentan su tamaño?
- ¿Las especies más sensibles serán aquellas que presenten mayor relación superficie-volumen (forma)?
- ¿La exposición a Cr(VI) a concentraciones constantes tiene mayores efectos a medida que se aumenta el tiempo de exposición al que son sometidos los renacuajos?
- ¿Existen diferencias en cuanto a la sensibilidad que presentan las larvas de las diferentes especies de una misma comunidad al Cr(VI)?

GENÉTICA, FILOGENIA, TOXICOLOGÍA

- ¿Las especies más emparentadas presentarán entre sí sensibilidades más similares que las especies filogenéticamente más alejadas?
- ¿La sensibilidad de las diferentes especies de anuros, está relacionada con la distancia filogenética entre las especies?, ¿En qué magnitud?
- ¿Cuál es la magnitud de la variabilidad intraespecífica, en cuanto a la sensibilidad al cromo, de las especies de la comunidad estudiada?
- ¿La sensibilidad de las diferentes especies de anuros es similar? (Variabilidad interespecífica).

- ¿La sensibilidad de las diferentes especies de un mismo género de anuros es similar? (Variabilidad Intergenérica).
- ¿La sensibilidad de las diferentes especies de una misma familia de anuros es similar? (Variabilidad interfamiliar).
- ¿Cuál es la magnitud de estas variabilidades (específica-genérica-familiar), en cuanto a la sensibilidad al cromo de las especies de la comunidad estudiada?

ECOLOGÍA, TOXICOLOGÍA

- ¿Cuáles son los factores que contribuyen a la variabilidad en la sensibilidad de las distintas especies de anuros al cromo y otros contaminantes?
- ¿Existe una relación entre el tipo ecológico de larva y la sensibilidad al Cr(VI) en bioensayos de toxicidad aguda con larvas en STD 25?
- ¿Las especies más sensibles serán aquellas que presenten larvas más acuáticas, más nadadoras?
- ¿La sensibilidad de las especies y su posibilidad de exposición que conlleva su posible muerte o extinción están asociadas con su estrategia reproductiva y/o su modo de vida?
- ¿La selección natural o intervención que el hombre realiza por medio de la contaminación, actúa sobre todos los renacuajos de un ecosistema de la misma manera?
- ¿Las larvas que poseen ciclos invernales poseen menor sensibilidad?
- ¿Las larvas bentónicas poseen menor sensibilidad que las nectónicas?
- ¿Existe una relación entre el hábito de vida de los adultos y la sensibilidad al Cr(VI) en bioensayos de toxicidad aguda con larvas en STD 25.?, ¿Existirá una relación entre sensibilidad y terrestrialidad?

TOXICOLOGÍA

- ¿La realización de ensayos de toxicidad aguda sobre las fases de vida inicial de las distintas especies de una comunidad permite determinar una clasificación de sensibilidad de estas especies?

- ¿Cuál de las especies estudiadas es la más adecuada para realizar ensayos de toxicidad aguda en laboratorio?
- ¿Se puede emplear la información biológica y ecotoxicológica obtenida en estudios de laboratorio para detectar impactos en campo?
- ¿Es posible, conociendo la respuesta letal y subletal a contaminantes químicos (cromo) de una comunidad de anuros, mediante bioensayos de toxicidad de laboratorio, junto al conocimiento de la biología de la misma, predecir riesgos potenciales sobre ecosistemas acuáticos naturales y modificados?

BIOLOGÍA, ECOLOGÍA

- ¿Se puede seleccionar en la región del Gran La Plata, un área de estudio que presente un bajo grado de modificación antrópica y niveles de contaminación aceptables, y que además por un lado represente a los ambientes de la provincia de Buenos Aires y por otro lado albergue en su interior un número de especies representativas, en cantidad y en diversidad taxonómica, de la batracofauna de esta provincia?
- ¿Cuáles son y qué magnitud poseen las variaciones climáticas anuales en la zona de estudio?
- ¿Qué fenómenos climáticos inusuales o raros afectan el clima de la región?
- ¿Cuáles son los factores ambientales que influyen directamente sobre la actividad reproductiva de cada una de las especies de anuros de la comunidad estudiada y en qué magnitud afectan su actividad reproductiva?
- ¿Cuáles son las características morfológicas que poseen las charcas elegidas para el presente estudio?
- ¿Cuáles son las distintas comunidades que componen el ecosistema y por qué grupos taxonómicos están compuestas?
- ¿Cuáles son las características fisicoquímicas del agua de ambas charcas y de la zona de estudio?
- ¿Cuáles son las especies de anuros que componen la comunidad estudiada?
- ¿Cómo es la biología de las especies estudiadas?

- ¿Cuáles son las características de la biología reproductiva de las especies estudiadas? ¿En qué época del año se reproducen, cómo ponen los huevos, cuántos huevos ponen?
- ¿Cómo es la biología de los renacuajos?, ¿En cuánto tiempo eclosionan?, ¿Cuáles son sus tasas de crecimiento y desarrollo?, ¿Cuál es su super-vivencia?, ¿Qué duración posee su ciclo larval?
- ¿Qué características de la biología de las especies son útiles para el diseño de bioensayos de laboratorio y de campo?, ¿Cuáles de ellas presentan limitantes para el desarrollo de experimentos controlados?
- ¿Por medio de qué métodos se pueden obtener huevos fecundados de las diferentes especies estudiadas?
- ¿Cuál es la dificultad de obtención de huevos?
- ¿Cuál es la disponibilidad de huevos a lo largo del año?
- ¿Cómo son las tasas de desarrollo de las diferentes especies de larvas, bajo condiciones controladas de laboratorio?
- ¿Cuál es el efecto que ejercen los diferentes niveles de los factores (que se seleccionarán posteriormente como factores fijos, dentro de las condiciones controladas del laboratorio), sobre la tasa de crecimiento, la tasa de desarrollo, la supervivencia y el tiempo que tardan en llegar a la metamorfosis?

3 HIPÓTESIS AUXILIARES

- La contaminación química afecta el normal funcionamiento de los ecosistemas acuáticos.
- La contaminación química afecta más a algunos componentes de los ecosistemas acuáticos que a otros.
- La contaminación química, además de los efectos indirectos asociados a las características del ecosistema, afecta de manera directa algún componente del ecosistema.
- La contaminación química afecta a los vertebrados acuáticos.
- La contaminación química afecta a las poblaciones de anfibios.

- La contaminación química afecta a las poblaciones de anuros.
- La contaminación química afecta la fase de vida acuática de los anuros.
- El cromo hexavalente actúa como xenobiótico, siendo su presencia en el ambiente señal de actividad antrópica.
- El cromo en bajas concentraciones presenta efectos perjudiciales sobre las larvas de anuros.

4 SUPUESTOS ASUMIDOS PARA LA INVESTIGACIÓN

- El Cr(VI) es un tóxico representativo de la contaminación química producida por el hombre sobre la naturaleza, por lo que resulta adecuada su utilización en el modelo de estudio propuesto en la presente investigación.
- Los anuros son más sensibles a la contaminación química en su fase de vida larval.
- El Cr(VI) afecta a las larvas de anuros de la comunidad estudiada a concentraciones bajas.
- La sensibilidad de las diferentes especies de anuros, está estrechamente relacionada con la distancia filogenética entre las especies

5 HIPÓTESIS A CONTRASTAR Y PREDICCIONES (HIPÓTESIS DE TRABAJO)

- **H1:** Las especies de anuros estudiadas son organismos adecuados para la realización de bioensayos en laboratorio.
- **H2:** La contaminación por cromo afecta la fase de vida acuática de los anuros estudiados.
- **H3:** El cromo hexavalente a bajas concentraciones es tóxico para las larvas de anuros estudiadas.
 - **Pr3:** El intervalo de concentraciones de cromo en el que se observan efectos letales (0-100%) se encuentra a bajas concentraciones, en el orden de las partes por millón (mgCr(VI)/L).

- **H4:** Existe un incremento de efectos perjudiciales, producidos por el Cr(VI) que se correlacionan positivamente con el aumento de la concentración del tóxico en el agua.
 - **Pr4.1:** Concentraciones muy bajas inhiben el crecimiento.
 - **Pr4.2:** Concentraciones subletales medias producen malformaciones y afectan el desarrollo.
 - **Pr4.3:** Concentraciones subletales altas producen la muerte de los organismos expuestos.
- **H5:** Los renacuajos disminuyen su sensibilidad al Cr(VI) a medida que aumentan su edad.
- **H6:** Los renacuajos disminuyen su sensibilidad al Cr(VI) a medida que aumentan su tamaño.
- **H7:** Los renacuajos disminuyen su sensibilidad al Cr(VI) a medida que aumentan el estadio de desarrollo.
- **H8:** La exposición a Cr(VI) a concentraciones constantes tiene mayores efectos a medida que se aumenta el tiempo de exposición al que son sometidos los renacuajos.
- **H9:** Existen diferencias en cuanto a la sensibilidad que presentan las larvas de las diferentes especies de una misma comunidad al Cr(VI).
 - **H9.1:** Las especies mas emparentadas presentarán entre sí sensibilidades más similares que las especies filogenéticamente más alejadas, reflejándose en las jerarquías taxonómicas reconocidas (género, familia).
 - **H9.2:** Existe una relación entre el tipo ecológico de larva y la sensibilidad al Cr(VI) en bioensayos de toxicidad aguda con larvas en STD 25.
- **H10:** La realización de ensayos de toxicidad aguda sobre las fases de vida inicial de las distintas especies de una comunidad permite determinar una clasificación de sensibilidad de estas especies.
- **H11:** Existe una relación entre el hábito de vida de los adultos y la sensibilidad al Cr(VI) en bioensayos de toxicidad aguda con larvas en STD 25.
 - **Pr11:** Los adultos más acuáticos presentarán menor sensibilidad que los menos acuáticos (más terrestres).
- **H12:** Se puede emplear la información biológica y ecotoxicológica obtenida en estudios de laboratorio para detectar impactos en campo.

- **H13:** El estudio de la respuesta letal y subletal a contaminantes químicos (cromo) sobre comunidades de anfibios anuros con bioensayos de toxicidad de laboratorio, junto al conocimiento de la biología de las mismas, permite predecir riesgos potenciales de estos contaminantes sobre ecosistemas acuáticos naturales y modificados.
- **H14:** La sensibilidad de las especies y su posibilidad de exposición que conlleva su posible muerte o extinción están asociadas con su estrategia reproductiva.

6 OBJETIVOS GENERALES

- Generar información básica, que sirva como fundamento para contestar las preguntas de investigación formuladas en el presente trabajo de tesis.
- Generar información básica sobre la biología y ecología de las especies de anuros que componen la comunidad estudiada, particularmente en su fase larval.
- Establecer las condiciones de ensayo y la metodología adecuada, que permitan la comparación de la sensibilidad al Cr(VI) entre especies o entre otros agrupamientos realizados.
- Seleccionar entre las técnicas estadísticas más utilizadas en esta disciplina, un procedimiento - conjunto de técnicas combinadas - que permita la resolución de bioensayos y la comparación de resultados obtenidos en los diferentes bioensayos, mediante pruebas de significancia.
- Establecer, utilizando bioensayos de toxicidad aguda en laboratorio, niveles de sensibilidad para las distintas especies estudiadas, empleando como referencia la respuesta al Cr(VI).
- Seleccionar, a partir de los estudios previos en campo y en laboratorio, las especies de anuros más relevantes para el desarrollo de herramientas bioanalíticas (sistema integrado con una batería de bioensayos de laboratorio utilizando especies críticas e información biológica y ecológica de campo) como indicadores de riesgo ecológico.
- Evaluar la posibilidad de utilizar las especies estudiadas como organismos indicadores de niveles críticos de contaminación.
- Considerar la aplicación potencial del sistema de diagnóstico al monitoreo regional de efectos biológicos dentro de programas de control ambiental.

7 LIMITACIONES Y ALCANCES

Las limitaciones del presente trabajo de tesis están relacionadas básicamente con el desconocimiento de las especies seleccionadas en variadas áreas temáticas. Es por ello que una parte importante de la investigación estuvo orientada a cubrir los huecos existentes en la información mencionados en la introducción.

Si bien se formularon preguntas de investigación con distinto grado de detalle, sólo se intentan responder aquéllas que se sitúan en el seno de la investigación básica, condicionando la investigación aplicada, que predomina en el campo de la ecotoxicología.

Una vez abordadas las preguntas de investigación básica estaremos en condiciones de abordar preguntas de investigación que intenten resolver problemáticas vinculadas con las preocupaciones de la sociedad actual.

CAPÍTULO III

El ecosistema

1 EL ÁREA DE ESTUDIO

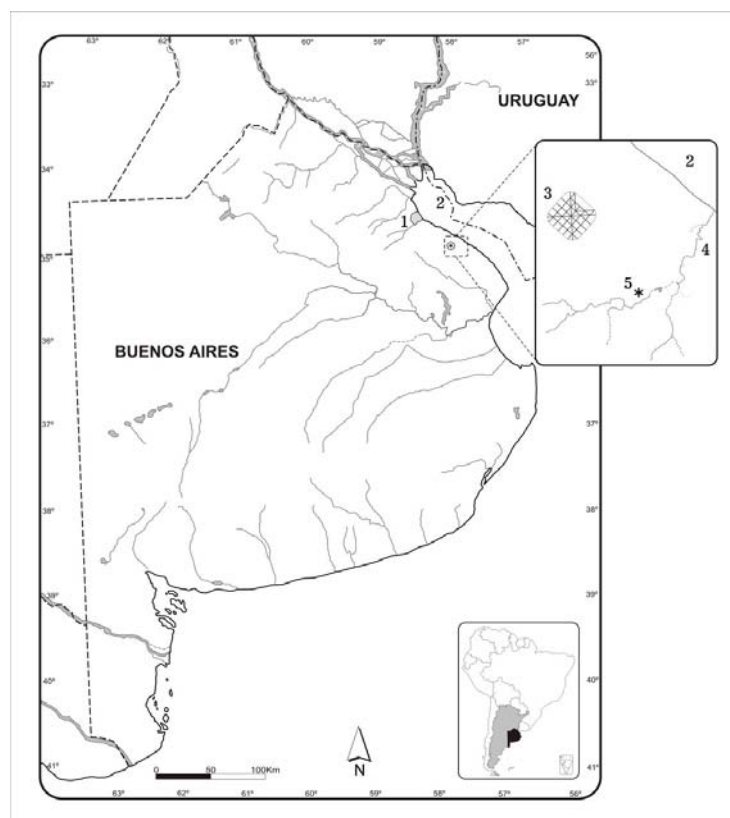
1.1 Introducción

Área de estudio: está situada en las afueras de la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires, y comprendida dentro del valle de inundación del arroyo “El Pescado” (Ver Figura 1, página siguiente). La región considerada se encuentra en la provincia biogeográfica definida por Cabrera y Willink (1973) como “Provincia Pampeana”, y está incluida en la Región denominada “de las Pampas” por Canevari *et al.* (1998), quien, según la convención Ramsar, determinó 19 regiones de humedales para América del Sur. Según este autor, la Región de las Pampas se distingue por la abundancia y la diversidad de humedales (sólo en la provincia de Buenos Aires se han relevado 1.429 lagunas) reconociéndose entre éstas, como mínimo, 15 tipos de humedales según la clasificación de Dugan (1992). Los humedales de esta región se agrupan en seis zonas, considerando las cuencas a las cuales pertenecen y sus características geomorfológicas. La zona de estudio pertenece, según Canevari, a la “cuenca parano-platense”, la cual posee en su región inferior, denominada franja costera sur del Río de la Plata, numerosos arroyos y afluentes con distintos grados de contaminación. El mismo autor menciona a “El Pescado” como ejemplo de los arroyos pertenecientes al partido de Magdalena que presentan un hábitat único y posee el menor nivel de alteración, a pesar de estar en una de las zonas más industrializadas y densamente pobladas de la región.

Arroyo El Pescado: se encuentra al este de la ciudad de La Plata. Es típico de la región y corre de oeste a este, atravesando dos regiones geomorfológicas diferenciadas: la zona interior y la planicie costera. En general se trata de llanuras con poco relieve, con una cota de 10 m.s.n.m. en la mitad de su recorrido y 20 m.s.n.m. en las nacientes (Instituto Geográfico Militar. Carta Topográfica 3557-20-1), llegando a 30 m sus áreas topográficamente más altas, con una pendiente regional de aproximadamente 0,2%. Constituye uno de los cauces principales en la región noreste de la provincia de Buenos Aires y posee 10 cauces menores (E.A.S.NE, 1970), entre los que se puede mencionar al arroyo Cajaravilla, el arroyo Difuntos y el Arroyo del Sauce. El arroyo El Pescado, tiene un desarrollo de tipo dendrítico y un recorrido subcircular. La superficie total de su cuenca es de 356 km² y el valle de inundación alcanza en algunas partes los 500 m de ancho. La mayor parte de su recorrido se desarrolla sobre la llanura alta, donde el curso es alimentado por agua de lluvia y subterránea, bien definido en la zona interior. A mitad de recorrido forma una laguna y una zona de bañados muy extensa (334

Hectáreas). Luego alcanza la planicie de tierras bajas e inundables de la margen costera (Ronco *et al.*, 2001; Camilión *et al.*, 2003), para desembocar finalmente en el Río de la Plata.

Figura 1 Ubicación del valle de inundación del arroyo “El Pescado” en la provincia de Buenos Aires



Fitogeográficamente, el arroyo El Pescado se encuentra ubicado dentro del distrito Pampeano Oriental de la Provincia Pampeana. Este distrito comprende el noreste de Buenos Aires hasta Tandil y Mar del Plata, y su vegetación característica – comunidad clímax– (Cabrera, 1976) es la estepa o seudoestepa de gramíneas.

Es importante destacar que este suelo ha sido usado desde hace siglos para la ganadería y agricultura extensiva, lo que ha provocado un empobrecimiento y hasta desaparición de las comunidades vegetales originales. Durante los últimos cuarenta años, las ecoregiones que integran la baja cuenca del Río de la Plata, han estado expuestas a una creciente intervención humana, marcada por un aumento considerable en la proporción de la superficie cultivada (Viglizzo, 2006). Asimismo, los ambientes próximos al arroyo, además de sufrir esta degradación, han estado sujetos a modificaciones y alteraciones por el avance del conglomerado urbano perteneciente al Gran La Plata.

Actualmente, la región comprendida en el área de influencia del arroyo El Pescado se encuentra convertida en agroecosistemas cuyo grado de explotación no ha sido cuantificado. A pesar de este desconocimiento, puede observarse que dicha explotación no es tan extensiva como antiguamente. Por otra parte, en la zona donde se encuentran las nacientes del arroyo se aprecia un importante avance de la urbanización. En la actualidad este proceso constituye, tal vez, la mayor modificación del ambiente, debido a la canalización de los cauces originales y a la pérdida de hábitats por la actividad antrópica.

Ambientes de importancia para los anuros: Como ya se ha mencionado, en el valle de inundación del arroyo El Pescado existe gran variedad de ambientes propicios para el desarrollo de distintas poblaciones de anuros. Se pueden diferenciar tres grandes tipos de ambientes, todos ellos humedales, según la Convención Ramsar¹ (2000):

Ambientes lénticos: Lagunas permanentes como las que se forman en la mitad del recorrido del arroyo (ver Figura 2, área 3, página subsiguiente). Bañados generalmente de tipo semipermanente que varían en tamaño y número de acuerdo a la época del año y la disponibilidad hídrica. Se encuentran vegetados principalmente por juncuales (*Schoenoplectus*, *Juncus*), totorales (*Typha spp.*) y pajonales (*Cyperus spp.*).

Ambientes lóticos: Sectores marginales de los arroyos de llanura. El desarrollo de la costa varía en función del sector observado y de las modificaciones antrópicas sufridas. Se pueden observar extensos juncuales, totorales y pajonales de cortadera (*Cortadeira seolloana*). En algunos sitios altos o con desarrollo de albardón se asientan ejemplares de tala (*Celtis tala*) y cina cina (*Parkinsonia aculeata*) relativamente dispersos.

Ambientes de pastizal: Lagunas temporarias (charcas) situadas dentro de los pastizales. Estos ambientes, como dijimos antes, han sido utilizados como agroecosistemas, y de acuerdo a la intensidad con la que fueron utilizados, presentan distintos grados de alteración.

Campos destinados al pastoreo de ganado: Se observan matas de gramíneas sembradas como forraje del género *Agropyron* agrupadas en función de la fertilidad y humedad del suelo y la influencia del ganado. Entre estas matas de pasto crecen numerosas especies de hierbas no graminiformes y existen también pajonales de cardas (*Eryngium spp.*) en zonas anegadas. La cobertura de este ambiente varía según la época del año y los diferentes ambientes. Las charcas permanentes y semipermanentes suelen ser utilizadas por el ganado como bebederos y lugares de refresco, lo que aumenta la alteración de su suelo, dado que no sólo éste es pisoteado sino que el ganado aporta mucha materia orgánica producto de sus heces.

¹ La Convención Ramsar define humedal como: “Extensiones de marismas, pantanos, turberas o aguas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluyendo las extensiones de aguas marinas cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros”.

Campos utilizados para agricultura: Su cobertura está dada en función del tipo de siembra y la época del año. No obstante la disponibilidad de ambientes aptos para las distintas especies de anuros, su aparición está restringida a los lugares donde no se puede cultivar debido a que son inaccesibles para la maquinaria (generalmente zonas anegadas o de relieve complicado). Estas zonas actúan como refugios en parches en los que se concentran las distintas especies que habitan el área cultivada, y suelen presentar una gran diversidad. Lamentablemente, estos ambientes acuáticos (particularmente sus sedimentos) son sumideros de los contaminantes que provienen de la aplicación de pesticidas, ya sea directamente o por escorrentía superficial.

Riesgos y amenazas para la conservación de los ambientes: A pesar de la existencia de una gran cantidad y variedad de ambientes propicios para la reproducción y el desarrollo de las distintas especies de anuros que habitan la región estudiada, se presentan diversos riesgos y amenazas. Por un lado, la expansión de las actividades agropecuarias (ganadería y agricultura) conlleva perjuicios como el deterioro y la modificación de ambientes, la fragmentación de hábitat y el aumento de la contaminación. La expansión urbana, por otro lado, trae asociadas consecuencias como la canalización de limnotopos, que contribuyen a la fragmentación de hábitat; la industrialización, el aumento de sistemas de transporte y de producción de energía, que a su vez aumentan la contaminación; la sobreexplotación de recursos y el exceso de población, desencadenando el deterioro y la modificación de los ambientes naturales. Todo esto atenta contra los ambientes que aún no han sido modificados, y produce una reducción significativa de la fauna autóctona, comenzando por un empobrecimiento de los ambientes, luego la fragmentación del hábitat y finalmente el desplazamiento de poblaciones naturales.

Objetivo: Seleccionar un área de estudio que presente un bajo grado de modificación antrópica y niveles de contaminación aceptables. Además, que sea característica de los ambientes de la provincia de Buenos Aires y que albergue un número de especies representativas, en cantidad y en diversidad taxonómica, de la batracofauna bonaerense.

1.2 Metodología

El área de estudio fue seleccionada a partir de recorridos y muestreos previos realizados en diferentes localidades de los alrededores de la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires: Villa Elisa, Gorina, Gonnet, Punta Lara, Ensenada, Berisso, La Plata, Los Hornos, Lisandro Olmos, Coronel Brandsen, Etcheverry, Arana, Ignacio Correa, Poblet, Oliden, General Mansilla (Bavio), Magdalena, Atalaya y Punta Indio. Estos muestreos tenían entre sus objetivos adquirir experiencia en campo en relación con la observación de la biología y ecología de las distintas especies de anuros, relevar información biológica y contrastarla con la

información asentada en la bibliografía. Nos referimos a las observaciones realizadas entre 1921 y 1927 por Fernández y Fernández, luego por Avelino Barrio (1960 a 1970) y José María Gallardo (1960 a 1980) sobre la anfibiofauna de la provincia de Buenos Aires. Por otro lado, se procuró coleccionar ejemplares adultos de las distintas especies que fueron depositados en la colección de herpetología del Museo de La Plata y adquirir conocimientos sobre los caracteres morfológicos utilizados para la identificación de los distintos grupos taxonómicos de anuros.

Para la elección del área de estudio hemos realizado un análisis del balance costo beneficio teniendo en cuenta los siguientes puntos:

- 1) Información regional sobre actividades y uso de la tierra.
- 2) Abundancia y riqueza de especies de anuros en cada sitio explorado.
- 3) Accesibilidad de los distintos lugares:
 - i) Costo en tiempo y dinero contemplando las distancias.
 - ii) Dificultades de acceso ya sea por la peligrosidad de los sitios reproductivos (cuerpos de agua profundos, barrancas, vegetación densa, pantanos o terrenos muy blandos o inseguridad social).
 - iii) Dificultades para obtener permisos y autorizaciones por parte de particulares o de instituciones gubernamentales.
- 4) Grado de urbanización, modificaciones asociadas con el uso de los campos.
- 5) Grado de contaminación basado principalmente en la literatura científica publicada para los distintos cuerpos de agua de la región.

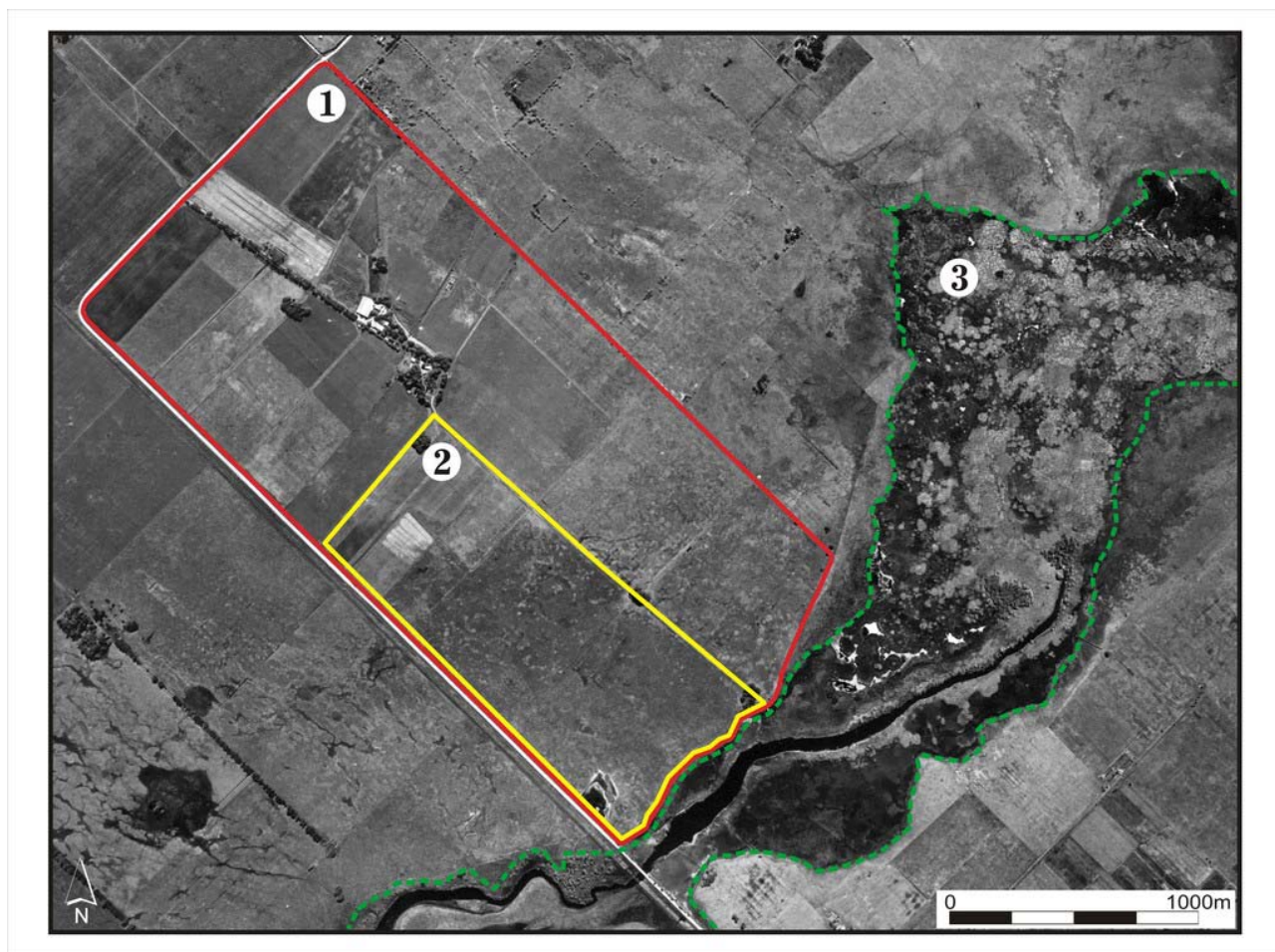
1.3 Resultados

Como resultado de la evaluación de los puntos anteriores, seleccionamos la región media de la planicie de inundación del arroyo El Pescado. Dentro de esta área elegimos particularmente el campo “Santa Ana” como sistema de estudio para desarrollar el presente trabajo de tesis (Ver Figura 3, más adelante). Luego de obtener las autorizaciones correspondientes, tuvimos acceso a información sobre la historia y el manejo actual del campo a través de su propietario, Rubén Cobeñas y del encargado, Sergio Molfesa.

Descripción del sistema de estudio: El establecimiento Santa Ana se encuentra a mitad del recorrido del arroyo El Pescado (35°01'08"S; 57°51'28"O). Es un campo de aproximadamente 300 hectáreas, que posee 180 hectáreas destinadas al pastoreo de ganado bovino para tambo. En la actualidad y desde hace ya diez años la carga animal es de casi dos vacas y media por hectárea, realizándose un manejo rotativo del ganado en 6 lotes de 20 hectáreas cada uno. Este campo comprende principalmente ambientes de pastizal y, en sus sectores topográficamente más bajos, con siete charcas semipermanentes, existe un sector que limita con el arroyo El Pescado conformando un juncal de alrededor de 10 metros de ancho. Esto ofrece una gran amplitud de ambientes propicios para la

reproducción de las distintas poblaciones de anuros que habitan este ecosistema. Para realizar un análisis detallado de la biología de las especies estudiadas, seleccionamos dos de las charcas que eran utilizadas como sitios reproductivos, a las que denominamos Charca A y Charca B (ver Figura 3, página subsiguiente).

Figura 2 Fotografía aérea del área en estudio



Ambas son cuerpos de agua semipermanentes, de similares dimensiones, separadas por 394 m en línea recta perpendicular al curso del arroyo, y a 90 m del arroyo la más cercana (Charca B). De cada una de ellas realizamos una descripción morfológica (ítem 3.b), una descripción florística (ítem 3.c), una descripción faunística con el listado de especies de las distintas poblaciones de vertebrados que frecuentan o habitan estos limnotopos (ítem 3.d), una caracterización fisicoquímica del agua (ítem 3.e), y monitoreos de larvas y adultos de los anuros objeto de este estudio (ítem 2).

2 EL CLIMA

2.1 Introducción

El área estudiada es subtropical, de clima templado, con veranos largos y calurosos e inviernos fríos. Según Thornthwaite y Mather, (1955), se clasifica como de tipo B1 B'2. El contraste de las estaciones es bien marcado. La temperatura media anual es de 16°C, con temperatura media y extrema de 24 y 43 °C respectivamente para mitad de verano (enero) y de 9 y -5 °C para mitad de invierno (julio). La precipitación anual media alcanza los 1.000 mm, con distribución parcialmente uniforme, y la humedad relativa promedio es del 71%.

Objetivo inmediato: Caracterizar las variaciones climáticas anuales y su influencia sobre la actividad reproductiva de los anuros.

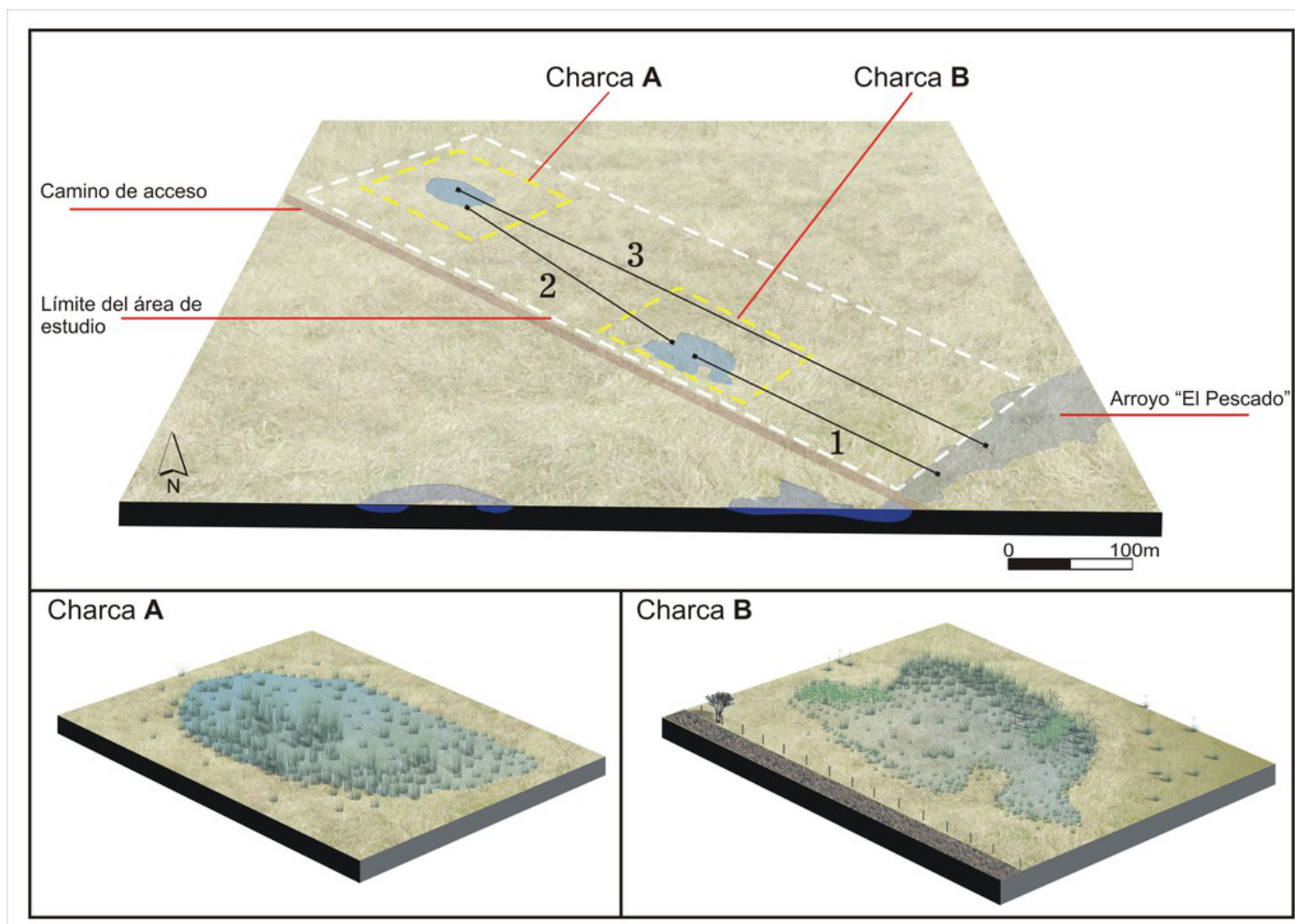
Objetivo a más largo plazo: Detectar cuáles son los factores ambientales que influyen directamente sobre la actividad reproductiva de cada una de las especies de anuros de la comunidad estudiada y en qué magnitud afectan su actividad reproductiva.

2.2 Metodología

2.2.a Caracterización del área de estudio (registros históricos)

Para caracterizar el clima del área de estudio consideramos la información que el Servicio Meteorológico Nacional - Fuerza Aérea Argentina (SMN), brinda a través de su página web (www.meteofa.mil.ar), en la que se caracterizan desde el punto de vista climatológico los meses y las estaciones de la Ciudad de Buenos Aires considerando los registros de los últimos 30 años (datos históricos), puntualmente, del período comprendido entre 1961 y 1990. Esta información fue interpretada y utilizada para realizar, conjuntamente con los datos tomados durante el período de estudio, la descripción climática del área. Denominamos variación estacional (VET) al conjunto de eventos climáticos ocurridos a lo largo de un año, que suceden de manera cíclica si los factores climáticos se comportaran según lo esperado (valores normales de los promedios mensuales registrados para un período de tiempo superior a 10 años). En las descripciones de VET se dejaron de lado los eventos inusuales o anormales, no cíclicos, que dieron particularidad a distintos meses o años de la totalidad del período de estudio, y que se describen en el ítem 2.3.b. Estas descripciones se realizaron respetando el agrupamiento de los distintos meses en cuatro estaciones (verano, otoño, invierno y primavera), lo que facilitó la interpretación de los resultados obtenidos, así como también la descripción ordenada y detallada de los eventos climáticos más relevantes ocurridos a lo largo del período de estudio (ítem 2.3).

Figura 3 Esquema del área de estudio



2.2.b Caracterización climática del período estudiado (1998-2004)

Para el análisis de las variaciones climáticas y su influencia sobre la actividad de los anuros utilizamos los registros de las condiciones climáticas para los 248 muestreos realizados entre enero de 1998 y diciembre de 2004, obtenidos de fuentes variadas.

Mediciones *in situ*: tomadas en campo a la hora de los muestreos (entre las 20 y las 23 horas): temperatura y profundidad del cuerpo de agua, temperatura del aire, humedad relativa y algunas otras apreciaciones como el estado del cielo (despejado-nublado), del tiempo (seco-húmedo-llovizna-lluvia), el viento (calmo-suave-moderado-fuerte), la luna (cuarto creciente-luna llena-cuarto menguante-luna nueva) y la visibilidad de la luna (se observa-no se observa).

Mediciones realizadas por el personal de la Estación Meteorológica del Aeropuerto de La Plata: temperatura (°C) a la hora de muestreo (21 hs), promedio diaria y promedio mensual, humedad relativa (%) a la hora de muestreo y promedio diaria, presión (hPa) a la hora de muestreo y promedio diaria, viento (km/h) a la hora de muestreo, precipitaciones (mm) diarias, promedio mensual y acumuladas.

Para el análisis de las variaciones climáticas y su influencia sobre la actividad de los anuros, todas las variables registradas fueron ingresadas en una matriz (matriz ambiental) con el objetivo de analizarlas con diferentes herramientas estadísticas.

En principio se realizó un análisis estadístico descriptivo y se construyeron climatogramas (gráficos de doble eje Y, en los que se representan la temperatura media mensual (eje Y derecho) y el total mensual de precipitación (eje Y izquierdo) para los meses del año (eje X), para cada año desde 1998 hasta 2004 (Ver Figura 4a-g en páginas siguientes). Además, con los datos históricos brindados por el SMN se construyeron tablas con valores medios y extremos a partir de las cuales se establecieron los rangos de variación normales o históricos de cada mes y estación, destacando aquellos acontecimientos que dentro del período de estudio escaparon a la tendencia general de los datos (eventos inusuales o anormales). Considerando los datos históricos de promedios de temperatura y precipitaciones mensuales, se construyó un climatograma de valores esperados (Figura 5, páginas subsiguientes) y un gráfico de dispersión de doble eje Y, para mostrar las variaciones de las precipitaciones totales y la temperatura promedio mensual a lo largo de los meses en los ocho años de estudio (Figura 6, más adelante).

Posteriormente, con la matriz ambiental construida, se efectuaron análisis exploratorios mediante la aplicación de las técnicas multivariadas de Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis de Agrupamientos (AA) para conocer la variabilidad conjunta de los datos obtenidos y el aporte de cada variable a los distintos componentes. Finalmente y con el objetivo de ver la influencia de los factores ambientales sobre la actividad reproductiva de cada una de las especies de anuros de la comunidad estudiada y en qué magnitud afectan su actividad

reproductiva, esta matriz ambiental fue utilizada para realizar un Análisis de Correspondencia Canónica (ACC) junto con la matriz biológica generada a partir de los muestreos en campo.

2.3 Resultados

En la Figura 4 se muestran los climatogramas para cada año desde 1998 hasta 2004. En ellos se puede observar la variación climática año a año. El climatograma de valores normales esperados según los datos del período 1961-1990 se muestra en la Figura 5; y en la Figura 6, la variación climática conjunta durante el período estudiado (Ver estas figuras en las páginas siguientes).

2.3.a Descripción de las variaciones estacionales típicas

A continuación se describen las variaciones estacionales típicas agrupadas en cuatro estaciones: verano, otoño, invierno y primavera.

El verano: Si bien astronómicamente el verano comienza el 21 de diciembre a las 9 horas 42 minutos y se extiende hasta el 20 de marzo a las 9 horas 33 minutos, las condiciones climáticas propias de esta estación del año se observan ya a mediados de diciembre y perduran hasta los primeros días de marzo. Por esta razón, en los informes climáticos, el Servicio Meteorológico Nacional considera como trimestre de verano el formado por los meses de diciembre, enero y febrero. Adoptaremos esta consideración.

Esta estación se caracteriza por una radiación solar intensa y tiempo caluroso durante el día, con las temperaturas medias más elevadas en el mes de enero. Si bien es una de las estaciones menos húmedas, el calor suele estar asociado, debido a la proximidad del Río de la Plata, con humedades elevadas, lo que da lugar al llamado “tiempo pesado”. En el período comprendido entre el 15 de diciembre y el 15 de febrero suele presentarse el fenómeno de “ola de calor”. Durante el mismo, por espacio de 2 a 8 días sucesivos, las temperaturas mínimas se elevan por encima de 23°C, las máximas lo hacen por encima de 30°C y la humedad relativa oscila entre 60% y 90%. Sin embargo, esa situación no suele persistir más de una semana debido al desarrollo de tormentas eléctricas y chaparrones seguidos por vientos secos del sudoeste que hacen descender la temperatura y la humedad.

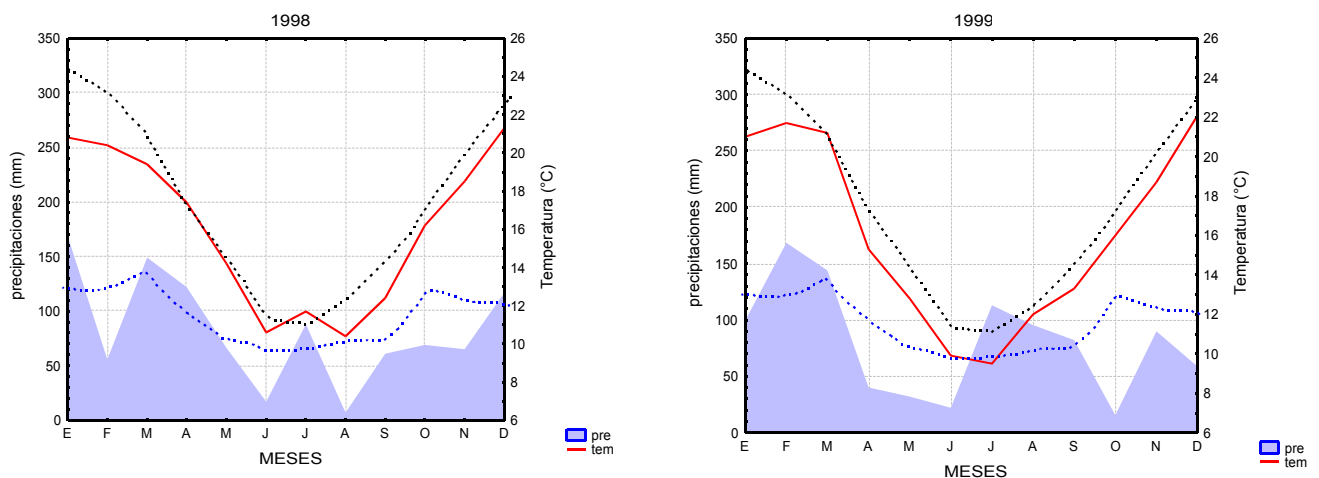
Específicamente en el área de estudio, la temperatura media estacional normal (referida al período 1961-1990) es de 23,6°C, y los valores medios de los meses que definen esta estación del año oscilan entre 23,0°C (diciembre) y 24,5°C (enero). La amplitud térmica diaria media es del orden de 10°C. En cuanto a los extremos térmicos, la temperatura más baja registrada durante el verano en el período 1906-2002, fue de 3,7°C y tuvo lugar el 8 de diciembre de 1923, mientras que la temperatura más alta del mismo período alcanzó 43,3°C el día 29 de enero de 1957.

Con respecto a la humedad relativa, asciende paulatinamente durante esta estación. Los valores medios normales de este parámetro llegan a 63% en diciembre, 64% en enero y 68% en febrero. No obstante, ocasionalmente pueden presentarse veranos más húmedos, con valores medios de humedad relativa superiores al 80%.

En relación con la precipitación, el verano es una estación muy lluviosa en Buenos Aires. Así, la media estacional totaliza 341,6 mm (105,0 mm en diciembre, 119,0 mm en enero y 117,6 mm en febrero), repartidos en 26 días con lluvia en promedio. Si bien los totales mensuales medios de precipitación en los meses estivales son del orden de 100 mm, excepcionalmente se pueden registrar valores superiores a 300 mm, tal como ocurrió en enero de 1953 (347,5 mm), de 2001 (337,5 mm) y en febrero de 2003 (403,3 mm). No obstante, los meses de verano pueden presentarse, en forma inusual, particularmente secos, como ocurrió en febrero de 1943, cuando se registraron solamente 0,7 mm.

En cuanto a los vientos predominantes, en esta estación del año predominan del noreste (20% en promedio), siendo su intensidad media del orden de 14 km/h.

Figura 4 Climatogramas desde el año 1998 hasta el 2004



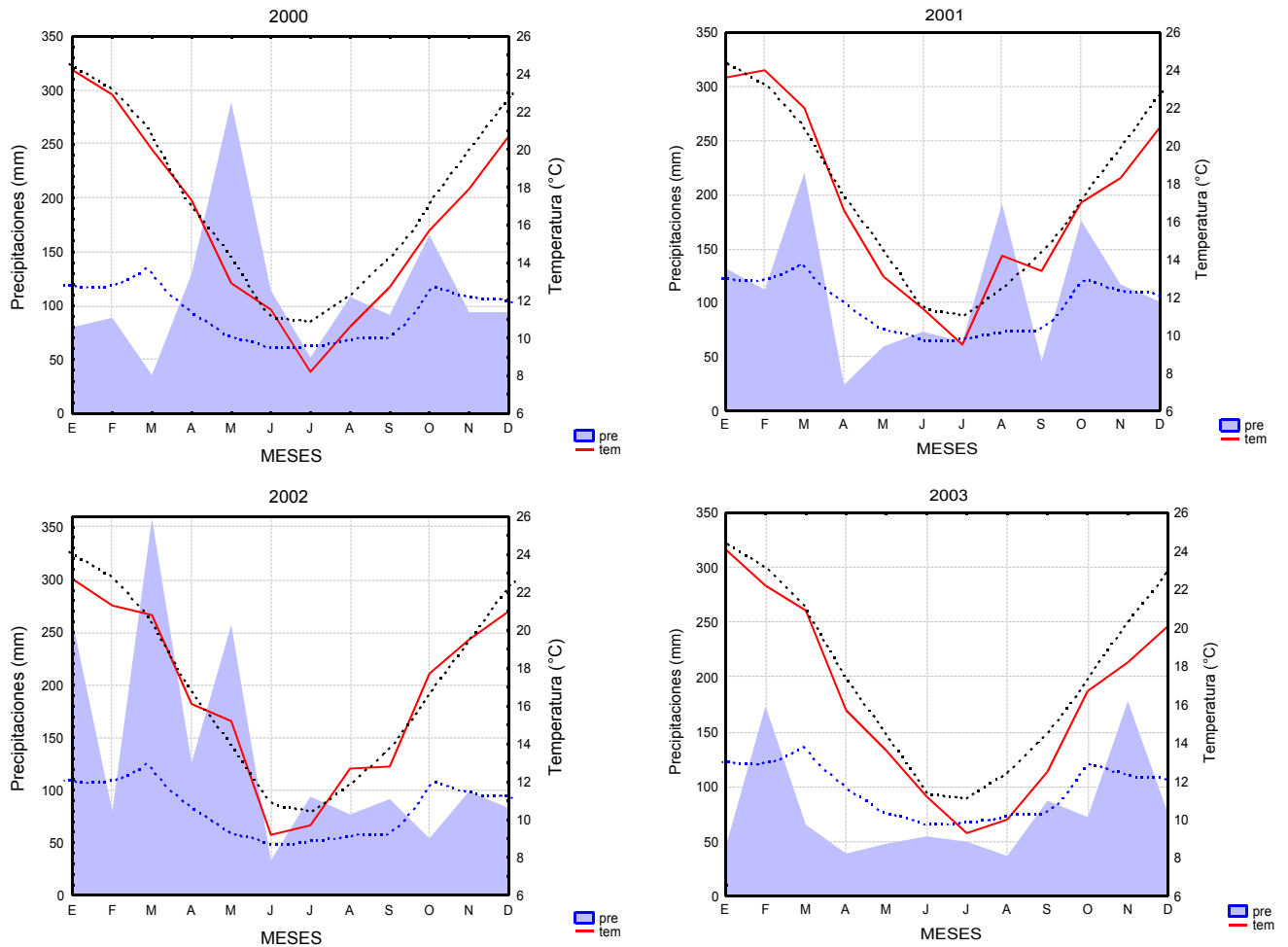


Figura 5 Climatograma de valores normales esperados según los datos del periodo 1961-1990

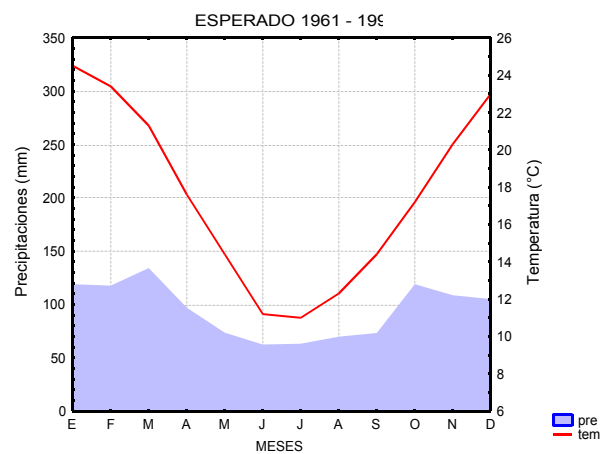
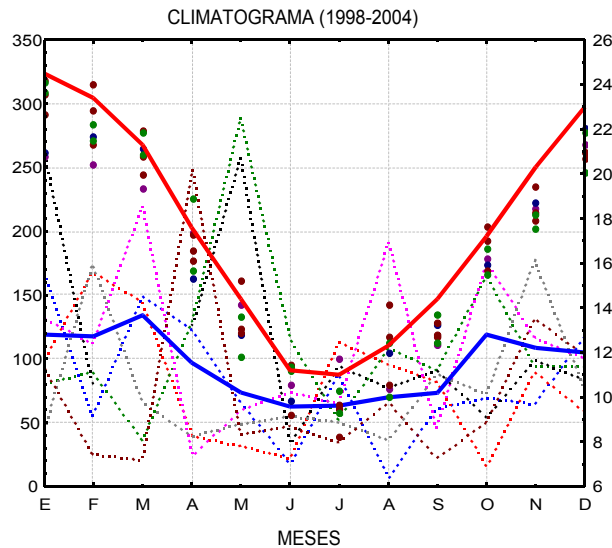


Figura 6 Variación climática conjunta durante el período estudiado



El verano, si bien se caracteriza por su radiación intensa, tiempo caluroso durante el día y por presentar los valores de temperatura más altos, es una estación térmicamente estable. Su variación neta de temperatura es de 1°C si consideramos los promedios mensuales. Al integrar las observaciones registradas en los muestreos realizados a campo, vemos que a fines de diciembre, debido a la disminución de las precipitaciones y al aumento gradual de la temperatura desde el comienzo de la primavera, el campo y las charcas se encuentran secos. Las gramíneas y el resto de la vegetación están en crecimiento, aunque cercanas a su segundo periodo de reposo, esta vez debido a la sequía. Los cuerpos de agua presentan un colchón de vegetación seca, relictos del crecimiento propicio de primavera y un suelo con grietas características del secado rápido. Para esta época, el ecosistema se encuentra en un período de gran actividad y crecimiento por parte de los consumidores primarios. Hay mucha actividad de insectos y de los eslabones de la cadena trófica que de ellos se alimentan: anuros, reptiles, aves y mamíferos. En el caso de la comunidad de anuros, hay gran número de juveniles (que metamorfosearon junto con el secado de las charcas) y adultos en actividad. En ambos casos se alimentan y acumulan energía para superar las etapas posteriores de reproducción y/o hibernación.

Esta situación puede prolongarse durante todo el verano y se interrumpe cuando ocasionalmente se produce un pico de precipitaciones. En esos casos, se produce el llenado definitivo de las charcas y comienza el período reproductivo de la mayor parte de las especies de la comunidad. Sin embargo, lo habitual es que el período de lluvias asociado con el llenado definitivo de las charcas y el comienzo de la actividad reproductiva de las diferentes especies ocurra en marzo. En enero, las temperaturas llegan a los máximos valores del verano, y comienzan a bajar gradualmente a partir de febrero hasta alcanzar mínimos valores en invierno.

Los altos valores de temperatura que caracterizan esta estación, combinados con lluvias escasas, y la evapotranspiración generan un déficit hídrico importante. Esta situación estacional y los períodos de sequía² inducen en algunas especies de anuros un período de inactividad, producido por una baja en el metabolismo, denominado estivación.

El otoño: Si bien astronómicamente el otoño comienza el 20 de marzo a las 9 horas 33 minutos y se extiende hasta el 21 de junio a las 3 horas 46 minutos, las condiciones climáticas propias de esta estación del año se observan ya a principios de marzo y perduran hasta los primeros días de junio. Por esta razón, en los análisis climáticos, el Servicio Meteorológico Nacional considera como trimestre de otoño al formado por los meses de marzo, abril y mayo. Adoptaremos esta consideración.

El comienzo de esta estación del año se caracteriza por tiempo algo caluroso al mediodía y en las primeras horas de la tarde, con mañanas y noches agradables o frescas. Luego, los días se tornan frescos, con mañanas y noches frías.

Específicamente en la Ciudad de Buenos Aires, la temperatura media estacional normal (referida al período 1961-1990) es de 17,8°C, y los valores medios de los meses que definen esta estación del año oscilan entre 21,3°C (marzo) y 14,4°C (mayo). La amplitud térmica diaria media es del orden de 9°C. En cuanto a los extremos térmicos, la temperatura más baja registrada durante el otoño en el período 1906-2004, fue de -4,0°C y tuvo lugar el 27 de mayo de 1907; mientras que la temperatura más alta del mismo período alcanzó a 37,9°C, el día 7 de marzo de 1952. Asimismo, los otoños más cálidos resultaron ser los de los años 1980 y 2001 donde la temperatura media alcanzó los 20,1°C; mientras que el otoño más frío se observó en el año 1910, con 15,2°C de temperatura media.

Con respecto a la humedad relativa, asciende paulatinamente durante esta estación. Los valores medios normales de este parámetro llegan a 72% en marzo, 76% en abril y 77% en mayo. No obstante, ocasionalmente pueden presentarse otoños más húmedos, con valores medios de humedad relativa superiores al 80%. En relación con la precipitación, el otoño es una estación lluviosa en Buenos Aires y, especialmente durante el mes de marzo, todavía suelen observarse fenómenos de tormentas propias del verano. Así, la media estacional totaliza 304,7 mm (134 mm en marzo, 97,0 mm en abril y 73,6 mm en mayo), repartidos en 25 días con lluvia en promedio. En forma excepcional, mensualmente se pueden registrar valores superiores a 450 mm, tal como ocurrió en marzo de 1900 (544,7 mm) y de 1989 (476,6 mm). Sin embargo, los meses de otoño pueden presentarse, en forma inusual, particularmente secos, como ocurrió en mayo de 1887 y de 1904 en los cuales no se registraron precipitaciones. El otoño más lluvioso se registró en el año 1959 cuando llovieron 771,1 mm, mientras que el más seco fue el de 1968 cuando llovieron solamente 60,4 mm.

² Ausencia de lluvias por un periodo de tiempo prolongado y anormal para la región. Tiempo seco de larga duración.

Los vientos predominantes en esta estación del año son los del noreste (16% en promedio) y norte (15% en promedio), con una intensidad media del orden de 13 km/h.

Al integrar las observaciones registradas en los muestreos realizados a campo con la información obtenida del SMN obtenemos que en nuestro sistema de estudio el otoño comienza luego de un verano seco y caluroso, con un descenso gradual de la temperatura que comienza a insinuar noches y mañanas frescas con mediodías y tardes calurosas. Es una estación de transición en la que la temperatura presenta un descenso notable de 7°C netos en su duración. Marzo se caracteriza por ser el mes con mayor probabilidad de lluvias y es considerado en este estudio, junto con octubre, como los dos meses más lluviosos del año, que marcan lo que denominamos picos de lluvia.

Se espera que durante este mes se inunde el campo, el terreno quede anegado y las charcas lleguen a su máximo nivel de llenado. Esto puede coincidir con desbordes en el arroyo El Pescado. A partir de esta situación, la mayor parte de las especies de anuros que se encuentran en actividad, se dedica a la reproducción, y las especies inactivas pueden acelerar el metabolismo (activarse) y salir de la estivación para comenzar a comer e intentar reproducirse antes del invierno.

Con el llenado de las charcas, todas las comunidades comienzan a desarrollarse, luego de la pausa por falta de agua o de estabilidad en los niveles de agua normales. La profundidad de las charcas variará en función de los factores climáticos, pero se espera que permanezca en sus niveles máximos normales y la sucesión fitoplanctónica tienda hacia un estado trófico superior para la época en que comienza el invierno.

Durante el transcurso de abril y mayo la temperatura desciende notablemente; y a pesar de un marcado descenso en las precipitaciones, las charcas siguen aumentando su nivel de agua debido a la disminución de la evapotranspiración. Las cohortes de larvas que comenzaron a desarrollarse tempranamente en el año (enero, febrero o marzo) culminarán su metamorfosis a lo largo de esta estación. La actividad de juveniles y adultos de las distintas poblaciones de anuros disminuye en relación con el descenso de la temperatura, induciendo, en algunas especies de anuros, la hibernación (período de inactividad producido por un descenso del metabolismo asociado con el descenso de la temperatura), y en otros, promoviendo el último impulso reproductivo. Éste último caso es el de las especies con larvas invernales (especies que colocan sus huevos con la llegada del invierno y cuyas larvas se desarrollan lentamente durante esta estación, metamorfoseando en primavera).

El invierno: Si bien astronómicamente el invierno comienza el 21 de junio a las 3 horas 46 minutos y se extiende hasta el 22 de septiembre a las 19 horas y 23 minutos, las condiciones climáticas propias de esta estación del año se presentan ya a comienzos de junio y perduran hasta fines de agosto. A partir de allí, los

cambios que se producen en la circulación atmosférica hacen que el mes de septiembre presente características climáticas más propias de la primavera, razón por la cual, en los análisis climáticos del Servicio Meteorológico Nacional, este mes no es incluido en el invierno. En consecuencia, el período invernal ha sido definido por los meses de junio, julio y agosto. Adoptaremos esta consideración.

Esta estación del año se caracteriza por tiempo frío moderado durante el día y noches generalmente muy frías. Específicamente en la Ciudad de Buenos Aires, la temperatura media estacional normal (referida al período 1961-1990) es de 11,5°C, y los valores medios de los meses que definen esta estación del año oscilan entre 11,0°C (julio) y 12,3°C (agosto). En cuanto a los extremos térmicos, la temperatura más baja registrada durante el invierno en el período 1906-2004, fue de -5,4°C y tuvo lugar el 9 de julio de 1918, mientras que la temperatura más alta del mismo período alcanzó a 33,7°C el día 24 de agosto de 1996. Por otro lado, el invierno más cálido resultó ser el del año 1997 con una temperatura media de 13,3°C, y el más frío fue el del año 1916, con 7,7°C de temperatura media.

En cuanto a la humedad relativa, el invierno es la estación más húmeda del año. Los valores medios normales de este parámetro llegan a 79% en junio y julio, y bajan a 74% en agosto, pudiéndose observar inviernos con humedades superiores, del orden de 80% o más.

Con respecto a la precipitación media estacional, totaliza 198,7 mm repartidos en 23 días, en promedio. Si bien los meses invernales son los menos lluviosos del año (62,6 mm en junio, 66,3 mm en julio y 69,8 mm en agosto, en promedio), en ellos pueden registrarse, excepcionalmente, totales mensuales de precipitación superiores a 200 mm, tal como ocurrió en agosto de 1922 (277,8 mm) y en julio de 1932 (212,1 mm). Sin embargo, los meses del invierno pueden presentarse, en forma inusual, particularmente secos, como ocurrió en agosto de 1886 y en julio de 1916, meses en los cuales no se produjeron lluvias. En cuanto al invierno más lluvioso, éste se registró en el año 1922 cuando cayeron 539,5 mm, y el más seco ocurrió en el año 1916, cuando se registraron tan sólo 11,2 mm. Otro detalle digno de mencionar es que debido al gran crecimiento urbano, hace tiempo que ya no se registran nevadas en la Ciudad de Buenos Aires. Este fenómeno se observó por última vez el 27 de julio de 1928, y la nevada más importante tuvo lugar con anterioridad, durante los días 22 y 23 de junio de 1918.

Al integrar las observaciones registradas en los muestreos realizados a campo con la información obtenida del SMN obtenemos que el invierno en nuestro sistema de estudio está caracterizado por ser la estación más fría, más húmeda y con menos precipitaciones de todo el año, en la que no hay grandes variaciones de la temperatura, siendo la variación neta en su transcurso de 1°C si consideramos los promedios mensuales. El invierno comienza con un escenario estable ya que las charcas se encuentran llenas de agua (en su nivel máximo normal), con alta diversidad y gran biomasa desarrollada, tanto en las comunidades animales como en las vegetales. Durante el mes de junio el descenso de temperatura iniciado en abril-mayo continúa llegando a 11°C promedio y puede alcanzar temperaturas

mínimas de 0°C con frecuencia. Esto representa un umbral para la actividad reproductiva de la mayoría de las especies de anuros estudiadas. Este umbral comienza a visualizarse en el mes de abril, a partir del cual sólo cuatro especies de la comunidad continúan su actividad reproductiva (*Hypsiboas pulchellus*, *Pseudis minutus*, *Odontophrynus americanus* y *Scinax squalirostris*). Esta situación se hace más evidente en junio, cuando sólo existen registros de actividad reproductiva para *H. pulchellus*. En el caso de las larvas, para el mes de junio todas las cohortes de larvas que comenzaron a desarrollarse tempranamente en el año culminaron su metamorfosis. En este mes sólo se encuentran estadios tempranos de las especies que poseen larvas de tipo invernal y nuevas puestas de *H. pulchellus*, especie que continúa aún su actividad reproductiva.

En el mes de julio la temperatura disminuye a sus valores mínimos, lo que produce con frecuencia el congelamiento superficial de los cuerpos de agua y la muerte de gran parte de la biomasa vegetal (acuática y terrestre). Este es el segundo estado de reposo de la vegetación, esta vez a causa del frío. El cuerpo de agua se vuelve transparente por sedimentación del material particulado en suspensión (gran parte de éste formado por la gran biomasa de algas muertas a causa de las bajas temperaturas). Los peces y las larvas de anuros invernales, continúan en bajas densidades y exhibiendo bajas tasas de crecimiento y desarrollo.

La primavera: Si bien astronómicamente la primavera comienza el 22 de septiembre a las 13 horas 30 minutos y se extiende hasta el 21 de diciembre a las 9 horas 41 minutos, las condiciones climáticas propias de esta estación del año se observan ya a comienzos de septiembre y perduran hasta los primeros días de diciembre. Por esta razón, en los análisis climáticos del Servicio Meteorológico Nacional se considera como trimestre de primavera al formado por los meses de septiembre, octubre y noviembre. Adoptaremos esta consideración.

Esta estación del año se caracteriza por tiempo agradable durante el día, si bien las noches aún son frescas o frías. Específicamente en la Ciudad de Buenos Aires, la temperatura media estacional normal (referida al período 1961-1990) es de 17,3°C, y los valores medios de los meses que definen esta estación del año oscilan entre 14,4°C (septiembre) y 20,3°C (noviembre). La amplitud térmica diaria media es elevada (9°C a 10°C), debido al aumento marcado de las temperaturas máximas y a que las mínimas aún son relativamente bajas. En cuanto a los extremos térmicos, la temperatura más baja registrada durante la primavera, en el período 1906-2002, fue de -2,4°C y tuvo lugar el 14 de septiembre de 1925, mientras que la temperatura más alta del mismo período alcanzó a 36,8°C el día 27 de noviembre de 1955. Es necesario resaltar que la primavera más cálida registrada históricamente tuvo lugar durante el período de estudio, en el año 2002, con una temperatura media de 18,6°C.

Con respecto a la humedad relativa, desciende paulatinamente durante esta estación. Los valores medios normales de este parámetro llegan a 70% en septiembre, 69% en octubre y 66% en noviembre. No obstante, ocasionalmente

pueden presentarse primaveras más húmedas, con valores medios de humedad relativa superiores al 75%.

En lo que se refiere a la precipitación, la primavera es una estación muy lluviosa en Buenos Aires. Así, la media estacional totaliza 300,9 mm (73,3 mm en septiembre, 119 mm en octubre y 108,6 mm en noviembre), repartidos en 26 días con lluvia en promedio. Si bien los totales mensuales medios de precipitación en los meses primaverales son del orden de 100 mm, excepcionalmente se pueden registrar valores superiores a 300 mm, tal como ocurrió en octubre de 1967 (367,1 mm). Cabe destacar que el fenómeno de tormenta (descarga brusca de electricidad atmosférica que se manifiesta por un resplandor breve o relámpago y por un estruendo sordo o trueno), asociado a ocasional caída de granizo (precipitación en forma de chaparrón o chubascos de lluvia, de hielo o en ocasiones de nieve, nieve granulada o hielo granulado), se presenta con una frecuencia de 13 días en promedio durante la primavera. Sin embargo, los meses de primavera pueden presentarse, en forma inusual, particularmente secos, como ocurrió en septiembre de 1973 en el cual se registraron solamente 1,7 mm.

La primavera se caracteriza por presentar tiempo agradable durante el día con noches frescas o frías y es una estación de transición que lleva a un notable aumento de 6°C de temperatura. Al integrar las observaciones registradas en los muestreos realizados a campo con la información obtenida del SMN obtenemos que la primavera tiene su inicio luego de un invierno frío con heladas, en el que las charcas se mantuvieron con agua y las plantas acuáticas que poseen estructuras de soporte desarrolladas, con parte de su biomasa muerta en pie o en proceso de descomposición. La llegada de la primavera genera un aumento de la actividad o metabolismo del ecosistema, derivado del aumento notable de radiación, del fotoperíodo y de la temperatura. Este momento coincide frecuentemente con la llamada tormenta de Santa Rosa, una lluvia copiosa y abundante (ver apartado siguiente). El campo se inunda y las charcas rebasan su capacidad. Además, esto puede coincidir con el desborde del arroyo El Pescado. Bajo estas condiciones, el ecosistema en su totalidad aumenta su productividad. Todos los animales, junto con las comunidades vegetales, incrementan sus tasas de desarrollo y crecimiento, explotando las condiciones favorables. Hay un aumento considerable de la biomasa de la comunidad vegetal, ya sea acuática o terrestre y de los distintos eslabones de la cadena trófica. Hacia fines de la primavera la temperatura ya ha aumentado mucho y la disponibilidad de agua comienza a disminuir. Como resultado de la sucesión de la comunidad fitoplanctónica, el ecosistema acuático culmina en un estado trófico superior.

Durante el período de estudio se ha podido registrar en la primavera la reproducción de todas las especies de anuros que habitan el ecosistema estudiado. Es una estación en la que las distintas poblaciones, en distintas etapas de desarrollo, presentan mucha actividad. Se superponen entonces distintas clases de edades, metamorfosis de las formas invernales, reproducción de distintas especies y salida de hibernación de otras. Esto hace que esta estación sea una de las más favorables para el desarrollo de las distintas poblaciones de anuros.

En el transcurso de esta estación, la temperatura asciende gradualmente con una pendiente elevada y las lluvias merman su intensidad luego del mencionado pico que se da en el mes de octubre. Para mediados de noviembre, la mayor parte de las especies lograron su reproducción, algunas pueden haber alcanzado la metamorfosis, y la intensidad de la actividad reproductiva disminuye notablemente. Sólo quedan algunas especies reproduciéndose. La charca tiende a secarse y se producen floraciones algales. Antes de secarse definitivamente, las charcas están sumamente vegetadas por hidrófitas, es decir, plantas acuáticas con sostén como cola de zorro (*Ceratophyllum*), saeta (*Sagitaria*), falsa verdolaga (*Ludwigia*) y redondita de agua (*Hidrocotile*). Las tasas de descomposición aumentan, el oxígeno disuelto disminuye y la charca desprende gases con olores desagradables producto de la descomposición anaeróbica (metano, sulfídrico). Con el aumento de las temperaturas y sin lluvias, las charcas comienzan un proceso de desecamiento que finaliza entrado el verano, a fines de diciembre o principios de enero.

La tormenta de Santa Rosa: Debido a las condiciones climáticas propias de la transición entre el final del invierno y comienzo de la primavera, entre fines de agosto y principios de septiembre se producen fenómenos de tormentas ocasionalmente intensas que no son típicas del invierno, y por ello se identifica la primera gran tormenta con el nombre de tormenta de Santa Rosa. Si bien esta tormenta no se observa en todo el país, sí ocurre a nivel internacional. En Uruguay se produce frecuentemente y hay registros de que un fenómeno similar se observa en estas fechas en Sudáfrica y Australia (SMN, www.meteofa.mil.ar).

2.3.b Descripción de fenómenos climáticos inusuales

Denominamos fenómenos climáticos inusuales a todos aquellos eventos extraordinarios, no cíclicos, que dieron particularidades climáticas a diferentes intervalos de tiempo (semanas, meses, años) de la totalidad del período de estudio, y provocaron desviaciones respecto a las tendencias promedio o generales.

El fenómeno de “El niño”: El nombre de “El niño” se aplica a la aparición periódica de una corriente marina cálida en la zona oriental y central del océano Pacífico, a lo largo del Ecuador. La llegada de agua inusualmente cálida a esta zona puede provocar cambios imprevistos en los sistemas meteorológicos de todo el mundo, especialmente en las regiones tropicales. En promedio, “El niño” aparece cada cuatro años y medio, pero puede repetirse en sólo dos años o tardar hasta diez años en volver a ocurrir (Enciclopedia Encarta, 1993-2003. Microsoft Corporation)

Este fenómeno alterna con otro que lo sucede, denominado “La niña”. Durante “El niño”, la temperatura de la superficie del mar (TSM) en el océano Pacífico tropical central y oriental, se eleva notablemente por encima de los valores normales. Por el contrario, durante “La niña” la TSM desciende en esas mismas regiones por debajo de los valores normales. Estos cambios de la temperatura pueden originar

importantes variaciones del clima en todo el mundo. En nuestra región “El niño” se asocia con la ocurrencia de sequías, mientras que “La niña” provoca un aumento de las precipitaciones (SMN, 2003).

Dos episodios de “El niño” comprometieron los valores normales en nuestra zona de trabajo durante el período de estudio. El primero fue el evento de “El niño” que se produjo en 1997-1998, y que fue seguido por una fase prolongada de “La niña” que perduró hasta comienzos de 2001. El segundo episodio de “El niño” se dio durante el verano 2002-2003 y determinó una disminución de las lluvias estivales en la mayor parte del noroeste argentino. Esto se extendió a gran parte del continente sudamericano y a la zona de estudio. Este período de sequía se vio agravado por la circunstancia de que, cuando finalizó el fenómeno, la región entraba en la estación seca durante el invierno. Este último episodio mostró niveles moderados y bastante inferiores a los del fenómeno de 1997-1998.

Variaciones respecto de las tendencias promedio o generales: Al comparar los climatogramas obtenidos para cada año de estudio con los valores normales o esperados del período 1961-1990, pudimos detectar las variaciones que se anotan a continuación.

El año 1998 presentó un verano y una primavera (durante todo su período) más fríos que lo normal. El invierno fue notablemente más cálido que lo esperado (temperatura promedio de julio: 11,7°C). En cuanto a las precipitaciones, fue un año relativamente normal, que no presentó picos de lluvia marcados. El año 1999, al igual que el anterior, comenzó con un enero frío y una primavera con unos grados menos que lo normal. En cuanto a las precipitaciones, se puede destacar un final de invierno lluvioso, con un pico marcado en el mes de julio. El año 2000 resultó ser térmicamente normal, con una primavera unos grados más fría que lo esperado y un invierno marcado por el mes de julio con una temperatura promedio de 8,2°C. En cuanto a las precipitaciones, presentó un verano seco y un pico de lluvia anormal y tardío en mayo (288,8 mm), continuando con valores esperados el resto del año. El año 2001 comenzó con meses calurosos en febrero y marzo (24 y 22,1°C de temperatura promedio respectivamente), un invierno frío y un mes de agosto atípicamente caluroso y lluvioso (14,2 °C de temperatura promedio y 191,4 mm de lluvia acumulada). Esto provocó un final de invierno con un cambio abrupto de 5°C de aumento de temperatura promedio en un mes. Los picos de precipitaciones registrados fueron según lo esperado en marzo (220,3 mm) y octubre (176,1 mm). El 2002 comenzó con un verano lluvioso y continuó con un otoño muy lluvioso, con el primer pico de lluvias en marzo (358,1 mm) y lluvias de 126 y 257,1 mm en abril y mayo, siendo este último pico totalmente anormal y acompañado por temperatura media mensual de 15,2°C. Ambas condiciones superan lo esperado para esos meses. El año se presentó muy variable desde el punto de vista de la temperatura, marcado por una primavera calurosa con un pico cálido en octubre, con 17,7°C de temperatura promedio mensual.

El 2003 fue un año relativamente normal, con un invierno frío y marcado en julio, que se prolongó hasta agosto con temperaturas promedio mensuales de 9,3 y

10°C respectivamente. Las precipitaciones se mantuvieron por debajo de lo esperado durante todo el año. Esta escasez de lluvias se adjudica a la presencia del fenómeno de “El niño” anteriormente señalado. Los picos de lluvia estuvieron presentes en febrero (173,5 mm) y noviembre (178 mm), un mes antes y un mes después de lo esperado (marzo y octubre).

El 2004 se presentó dentro de los valores esperados desde el punto de vista térmico, destacándose un otoño caluroso, con temperaturas promedio mensuales en marzo y abril de 21,9 y 18,9°C. El verano fue seco, interrumpido por un abril muy lluvioso (247,9 mm) y continuando el resto del año con precipitaciones que se mantuvieron debajo de los niveles normales y sin picos marcados de lluvias.

2.4 Conclusiones

Los informes del SMN y los datos de la matriz ambiental analizados muestran una gran variabilidad del clima regional y acontecido en el área de estudio, como se observa en la Figura 6. En principio, esto dificultaría predecir acontecimientos climáticos. Pero si analizamos las descripciones de las VET para cada estación, detalladas con anterioridad, estamos en condiciones de afirmar que existe una tendencia climática anual cíclica. Esta tendencia, combinada con el conocimiento que surge del monitoreo biológico de las poblaciones de anuros nos permite predecir los posibles acontecimientos reproductivos con anterioridad a que ocurran. Estos conocimientos se pueden emplear en la planificación y diseño de muestreos que contemplen los períodos reproductivos de las distintas especies de anuros que son objeto de estudio y que habitan un área determinada, con márgenes de error relacionados con la variabilidad climática regional.

3 LOS SITIOS REPRODUCTIVOS

3.1 Introducción

Como mencionamos anteriormente, dentro del área de estudio fueron seleccionadas dos charcas semipermanentes (Charca A y Charca B, Figura 7, página siguiente) de similares dimensiones, utilizadas como sitios de reproducción por gran parte de las poblaciones de la comunidad estudiada. Si bien ambos sitios, situados dentro del campo estudiado, responden a las características generales del ambiente, poseen las particularidades que se detallan a continuación:

Distancia de la charca A al arroyo en línea recta 615 m, distancia de la charca B al arroyo 90 m, distancia entre las charcas 394 m. El objetivo del presente ítem es caracterizar los sitios reproductivos ecológicamente.

3.2 Descripción de las características morfológicas

Para la descripción de las características morfológicas se eligieron los siguientes parámetros: posición en el área de estudio; longitud máxima, ancho máximo y medio; elipsidad, perímetro, área; desarrollo de línea de costa; volumen, profundidad máxima y profundidad media.

Charca A: (Figura 8) Es un cuerpo de agua somero, formado en una zona baja del campo, a 615 m del arroyo en línea recta y a 70 m del camino (prolongación de la calle 30 del casco urbano de la ciudad de La Plata, que une Villa Garibaldi con Ignacio Correas) (Figura 7). Posición: 35° 01' 05,68"S; 57° 51' 32,79"W . Longitud máxima: 115,637 m. Ancho máximo: 54,112 m. Elipsidad: 0,53 m. Perímetro: 393.429 m. Área: 4610 m². Volumen: 405,95 m³. Profundidad máxima: 60 cm. Profundidad media: 35 cm. Esta charca posee un juncal de 76.361 m de perímetro situada en el centro del cuerpo de agua (Figura 7). Se puede considerar como un cuerpo de agua natural, reciente, formado como producto del anegamiento del campo en años consecutivos y que conservó el agua por ser un sector de tierras bajas o deprimidas.

Figura 8 Charca A

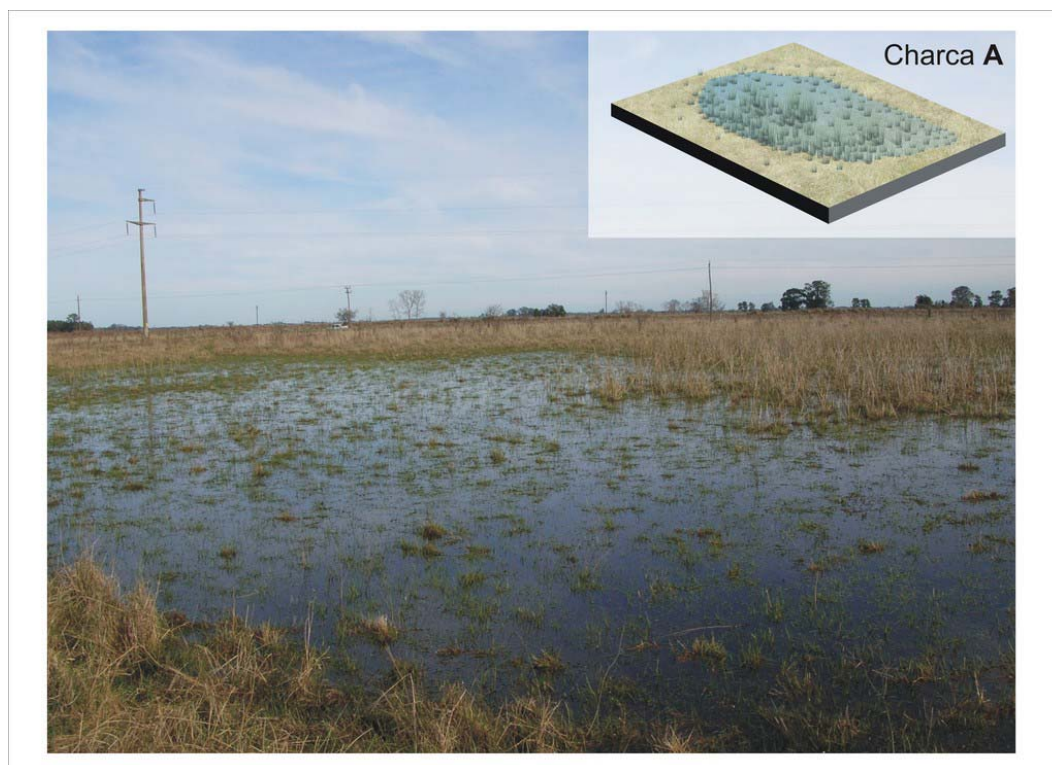
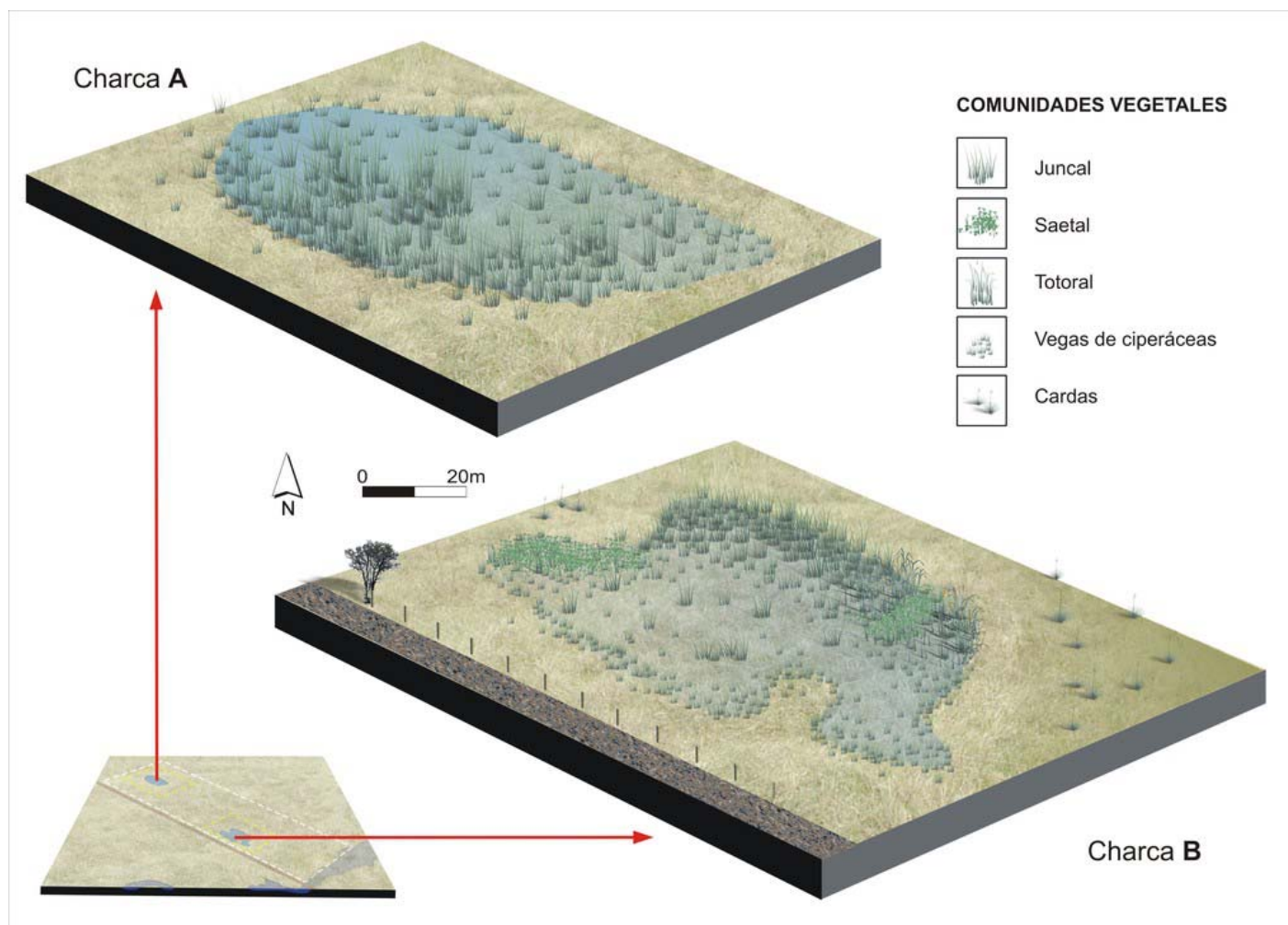
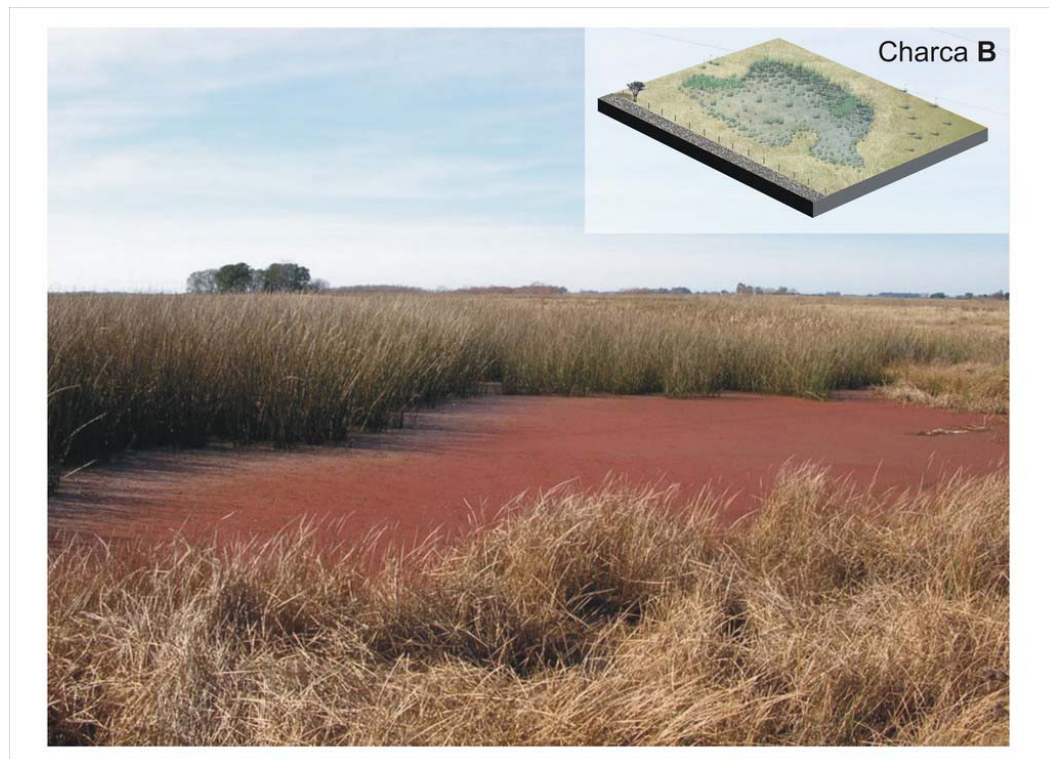


Figura 7 Charcas seleccionadas



Charca B: (Figura 9) Es un cuerpo de agua un poco más profundo que la charca A, situado a 90 m del arroyo y 10 m del camino (Figura 7), con una influencia directa del arroyo, ya que en los períodos de lluvia, se establecen conexiones entre la charca y el arroyo que permiten el intercambio de fauna. Posición: 35° 01' 15,58"S; 57° 51' 21,9"W . Longitud máxima: 58,153 m. Ancho máximo: 37,058 m. Elipsidad: 0,36 m. Perímetro: 257,190 m. Área: 3902 m². Volumen: 760,06 m³. Profundidad máxima: 90 cm. Profundidad media: 40 cm. Esta charca posee un juncal de 181,734 m de contorno que ocupa casi la mitad del área. También posee una prolongación a modo de lengüeta de 124,956 m de perímetro y 33,020 m de largo por 16,023 m de ancho, que permanece conectada gran parte del año, y que está incluida, junto con la Charca B, en una cubeta 50 cm más baja que el nivel del campo que la rodea. A diferencia de la anterior, esta charca se formó luego de la extracción de tierra por medio de maquinarias y fue evolucionando de diferente manera que la Charca A. Su antigüedad es mucho mayor. Actualmente, se encuentra casi totalmente cubierta por juncos y se esperaría, según los principios que explican la sucesión en este tipo de limnotopos, que vaya aumentando la cantidad de sedimentos hasta quedar totalmente colmatada y extinguirse (Botkin y Keller, 2000).

Figura 9 Charca B



3.3 Descripción florística de las charcas y sus alrededores

El campo estudiado es un pastizal modificado que suele sembrarse con una gramínea del género *Agropyron* para ser utilizado en el pastoreo bovino. Presenta vestigios de lo que fuera el pastizal descrito por Cabrera para esta zona: “Estepa de costa” (*Consociés de Stipa papposa*)³

Dentro de este pastizal artificial están situadas las Charcas A y B. La más antigua de ellas –Charca B– posee una mayor diversidad vegetal, además de una mayor biomasa, producto de la maduración de la comunidad. En la Charca A (Esquema - Figura 8) la vegetación palustre más evidente son los juncos (*Schoenoplectus californicus*) distribuidos en unos de sus márgenes, formando un “juncal” y rodeando la zona más profunda de la charca en donde se desarrollan las colas de zorro (*Ceratophyllum aquaticum*), *Potamogeton* y otras plantas acuáticas en altas densidades. Esta charca posee un sector de pastizal inundado con un núcleo central de duraznillos blancos (*Solanum glaucophyllum*). Aunque menos evidentes, también hay distintas especies acuáticas distribuidas en los distintos ambientes: lentejas de agua (*Spirodela intermedia*, *Lemna gibba* y *Wolffiella oblonga*), *Azolla filiculoides*, *Ludwigia peploides* e *Hydrocotyle ranunculoides*, entre otras.

La Charca B se diferencia de la anterior porque posee una mayor profundidad y porque su superficie se encuentra vegetada principalmente por juncos (*Schoenoplectus californicus*) y en menor proporción por totoras (*Typha latifolia*) (Esquema - Figura 9). Además, sobre los márgenes se observan abundantes ciperáceas (*Scirpus americanus* y *Juncus dichotomus* y *J. Imbricatus*). En sus zonas más profundas presenta vegetación acuática tupida (*Ceratophyllum* o cola de zorro, mezclada con *Lemna* o lentejas de agua y *Sagitaria* o saetas en número no mayor a 20 bien desarrolladas). En las zonas someras libres de juncos posee, además de las hidrófitas sumergidas y pasto anegado, dependiendo de la estación del año, una carpeta vegetal formada por helechito de agua (*Azolla*) y lentejas de agua (*Lemna*) que alternan sus densidades y/o coberturas. Rodeando esta charca existe un pajonal de cardas de mediano porte *Eryngium* sp. (Esquema - Figura 10).

Dentro de cada ambiente realizamos un inventario de especies que detallamos a continuación (Tabla 1) e intentamos definir la cobertura vegetal máxima registrada dentro de cada ambiente durante el período estudiado.

³ Referida por Cabrera (1949) como: comunidad no climáxica con un solo dominante.

Tabla 1 Lista de especies y cobertura vegetal relativa de ambas charcas

	Especie	Nombre común	Familia	Abundancia	
				CH - A	CH - B
1	<i>Potamogeton</i> sp.		Potamogetonaceae	I	P
2	<i>Ludwigia peploides</i>	cola de zorro	Onagraceae	I	M
3	<i>Schoenoplectus californicus</i>	junco grande	Juncaceae	I	M
4	<i>Hydrocotyle ranunculoides</i>	redondita de agua	Umbelliferae	I	P
5	<i>Typha latifolia</i>	tatora	Typhaceae	A	P
6	<i>Sagittaria montevidensis</i>	saeta	Allismataceae	A	P
7	<i>Juncus dichotomus</i>	junco chico	Juncaceae	P	I
8	<i>Juncus imbricatus</i>	junquito	Juncaceae	P	I
9	<i>Carex bonaerensis</i>		Cyperaceae		P
10	<i>Polygonum punctatum</i>	catay dulce	Poligonaceae	I	P
11	<i>Lemna gibba</i>	lenteja de agua	Lemnaceae	P	P
12	<i>Azolla filiculoides</i>	helechito de agua	Azollaceae	I	M
13	<i>Spirodella intermedia</i>	lentejita de agua	Lemnaceae	P	M
14	<i>Solanum glaucophyllum</i>	duraznillo blanco	Solanaceae	P	A
15	<i>Wolffiella oblonga</i>	lentejita de agua	Lemnaceae	P	I
16	<i>Spirodela intermedia</i>		Lemnaceae		I
17	<i>Ricciocarpus natans</i>		Ricciaceae (Bryophyta)	P	P
18	<i>Poligonum hidropiperoides</i>		Poligonaceae	P	
19	<i>Marsilea concinna</i>	trébol de cuatro hojas	Marsileaceae	P	
20	<i>Lilaeopsis caroliensis</i>		Umbelliferae	P	
21	<i>Eryngium</i> spp	carda	Umbelliferae	P	
22	<i>Myriophyllum aquaticum</i>	helechito de agua	Haloragaceae	I	P
23	<i>Scirpus americanus</i>	unquito	Cyperaceae	P	M

Referencias: A: Ausente; P: Poco abundante; I: Intermedio; M: Muy abundante

3.4 Descripción faunística de las charcas y zona de estudio

Además de la comunidad de plantas, nos pareció interesante realizar listas de especies que frecuentan o habitan estos limnotopos, dando mayor énfasis a fauna de vertebrados. A pesar de que estas descripciones no se realizaron de manera exhaustiva, consideramos que son de utilidad para reflejar más integralmente las características del ecosistema estudiado.

Invertebrados acuáticos

Si bien los invertebrados acuáticos no fueron objeto de estudio, se muestrearon indirectamente, ya sea por los copos utilizados como metodología de muestreo de renacuajos o por observaciones directas que fueron registradas en las anotaciones de campo. Ofrecemos a continuación (Tabla 2) una lista de los distintos grupos taxonómicos encontrados.

Tabla 2 Lista de invertebrados acuáticos presentes en ambas charcas (ND: no determinado)

Phylum	SubPhylum	Superclass	Clase	Subclass	Infraclass	Superorden	Orden	Familia		
Arthropoda	Atelocerata	Hexapoda	Insecta	Pterygota	Paleoptera		Collembola	Baetidae		
							Caenidae			
							Ephemeroptera	Aeshnidae		
							Odonata	Coenagronidae		
					Hemipteroidea	Heteroptera	Libellulidae			
							Belostomatidae			
							Corixidae			
							Notonectidae			
					Neoptera	Diptera	Chironomidae			
							Culicidae			
	Holometabola	Simulidae	Simulidae							
			Dytiscidae							
	Coleoptera	Helmidae								
		Hydrophillidae								
		Noteridae								
		Crustacea					Anomopoda	Bosminidae		
Branchiopoda	Cladocera						Conchostraca	Daphnidae		
								ND		
							Calanoida	ND		
							Maxilopoda	Copepoda	Cyclopida	Cyclopidae
								Ostracoda		ND
							Malacostraca	Eumalacostraca	Peracarida	Amphipoda
Anelida							Glossiphoniformes	Glossiphonidae		
							Hirudinea	Hirudiniformes	Macrobdehlidae	
							Oligochaeta		Tubificidae	
Mollusca							Basommatophora	Planorbidae		
							Gastropoda	Pulmonata	Physidae	
							Mesogastropoda	Ampullaridae		

Vertebrados

Hemos confeccionado listas de especies de cada una de las clases de vertebrados que habitan o frecuentan las charcas (sin distinguir entre una y otra) y sus alrededores, dentro del área de estudio.

Peces: Al igual que los invertebrados acuáticos, los peces fueron muestreados principalmente de manera indirecta, por la aplicación de muestreos con copos. También realizamos registros derivados de la aplicación de técnicas artesanales de pesca por parte de algunos pobladores del lugar y por observaciones directas en los muestreos nocturnos. A continuación (Tabla 3) ofrecemos la lista de especies de peces que habitan en ambas charcas, registradas durante el período de estudio.

Tabla 3 Lista de especies de peces que habitan ambas charcas

	Especie	Nombre común	Familia
1	<i>Cynolebia bellotti</i>	pavito, cynolebia	Cyprinodontidae
2	<i>Cnesterodon decenmaculatus</i>	panzudito, madrecita de agua	Poeciliidae
3	<i>Jenynsia lineata</i>	overito, tosquerito	Poeciliidae
4	<i>Phalloceros caudimaculatus</i>	madrecita de una mancha	Poeciliidae
5	<i>Astyanax</i> sp	mojarrita	Tetragonopteridae
6	<i>Hoplias malabaricus</i>	tararira	Erythrinidae
7	<i>Synbranchus marmoratus</i>	anguila	Synbranchidae
8	<i>Corydora</i> sp.	barre fondo, corydora	Callichthyidae

Anfibios: Los anfibios anuros son el objeto de estudio del presente trabajo de tesis, de modo que sólo detallamos una lista de especies, para permitir la comparación con los otros grupos de vertebrados (Tabla 4). Las técnicas de muestreo de los anuros se detallan en el ítem 4.1.b, los resultados de los muestreos en el ítem 4.1.c, y en el ítem 4.3 los aspectos de la biología de cada una de las especies utilizadas en este estudio. Sólo se encontraron en el área de estudio especies pertenecientes al orden Anura:

Tabla 4 Lista de especies de anuros que habitan o frecuentan las charcas y sus alrededores, dentro del área de estudio

	Especie	Nombre común	Familia
1	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	ranita del zarzal	Hylidae
2	<i>Dendropsophus nanus</i>	ranita enana	Hylidae
3	<i>Dendropsophus sanborni</i>	ranita de Sanborn	Hylidae
4	<i>Scinax squalirostris</i>	ranita hocicuda	Hylidae
5	<i>Scinax granulatus</i>	ranita roncadora	Hylidae
6	<i>Pseudis minutus</i>	ranita boyadora	Hylidae
7	<i>Odontophrynus americanus</i>	escuercito	Leptodactylidae
8	<i>Ceratophrys ornata</i>	escuerso	Leptodactylidae
9	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	rana criolla	Leptodactylidae
10	<i>Leptodactylus latinasus</i>	ranita piadora	Leptodactylidae
11	<i>Leptodactylus gracilis</i>	ranita	Leptodactylidae
12	<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	macaquito	Leptodactylidae
13	<i>Bufo arenarum</i>	sapo común	Bufonidae
14	<i>Bufo fernandezae</i>	sapo de jardín	Bufonidae

Reptiles: Los reptiles considerados fueron registrados mediante observaciones directas en el área de estudio y sus alrededores, como producto de los muestreos realizados. Para confeccionar la lista de especies o inventario consideramos la presencia de al menos un individuo de cada especie en el área de estudio (Tabla 5).

Tabla 5 Lista de especies de reptiles que habitan o frecuentan las charcas y sus alrededores, dentro del área de estudio

	Especie	Nombre común	Familia
1	<i>Hydromedusa tectifera</i>	tortuga acuática	Chelidae
2	<i>Clelia rustica</i>	culebra verde	Colubridae
3	<i>Liophis miliaris</i>	culebra	Colubridae
4	<i>Liophis poecilogyrus</i>	culebra	Colubridae
5	<i>Lystrophis dorbigni</i>	culebra falsa yarará	Colubridae
6	<i>Philodryas patagoniensis</i>	culebra verde	Colubridae
7	<i>Thamnodynastes hypoconia</i>	culebra verde	Colubridae
8	<i>Tomodon ocellatus</i>	culebra falsa yarará	Colubridae
9	<i>Amphisbaena spp</i>	viborita ciega	Amphisbaenidae
10	<i>Ophiodes vertebralis</i>	viborita de cristal	Anguidae
11	<i>Tupinambis merianae</i>	lagarto overo	Teiidae

Aves: A continuación ofrecemos la lista de especies de aves, sus nombres comunes y los usos de hábitat según la codificación que se detalla en las referencias (Tabla 6).

Tabla 6 Lista de especies de aves detectadas dentro de los límites establecidos como zona de estudio

	Especie	Nombre común	Familia	Abundancia	Estacionalidad	Uso de la charca
1	<i>Nothura maculosa</i>	inambú común	Tinamidae	E	R	P
2	<i>Rollandia rolland</i>	macá común	Podicipedidae	R	R	D
3	<i>Podilymbus podiceps</i>	macá pico grueso	Podicipedidae	R	R	I-D
4	<i>Phalacrocorax olivaceus</i>	biguá	Phalacrocoracidae	E	R	V
5	<i>Ardea cocoi</i>	garza mora	Ardeidae	R	R	V
6	<i>Syrigma sibilatrix</i>	chiflón	Ardeidae	C	R	P
7	<i>Ardea alba</i>	garza blanca	Ardeidae	E	R	V
8	<i>Egretta thula</i>	garcita blanca	Ardeidae	E	R	D
9	<i>Bubulcus ibis</i>	garcita bueyera	Ardeidae	C	R	P
10	<i>Butorides striatus</i>	garcita azulada	Ardeidae	R	R	D
11	<i>Nycticorax nycticorax</i>	garza bruja	Ardeidae	E	R	V
12	<i>Ciconia maguari</i>	cigüeña americana	Ciconiidae	R	R	V
13	<i>Phimosus infuscatus</i>	cuervillo cara pelada	Threskiornitidae	E	R	D
14	<i>Plegadis chihi</i>	cuervillo de cañada	Threskiornitidae	E	R	D
15	<i>Dendrocygna viduata</i>	sirirí pampa	Anatidae	E	R	V
16	<i>Anas flavirostris</i>	pato barcino	Anatidae	E	R	D
17	<i>Elanus leucurus</i>	milano blanco	Accipitridae	E	R	P
18	<i>Circus buffoni</i>	gavilán planeador	Accipitridae	C	R	P
19	<i>Circus cinereus</i>	gavilán ceniciento	Accipitridae	E	M-A	P
20	<i>Rupornis magnirostris</i>	taguató común	Accipitridae	E	R	V
21	<i>Caracara plancus</i>	carancho	Falconidae	A	R	P
22	<i>Milvago chimango</i>	chimango	Falconidae	A	R	P
23	<i>Falco sparverius</i>	halconcito colorado	Falconidae	E	R	P
24	<i>Aramus guarauna</i>	carau	Aramidae	R	R	V
25	<i>Pardirallus sanguinolentus</i>	gallineta común	Rallidae	E	R	D
26	<i>Laterallus melanophaius</i>	burrito común	Rallidae	E	R	D
27	<i>Fulica leucoptera</i>	gallareta chica	Rallidae	E	R	D
28	<i>Gallinula chloropus</i>	pollona negra	Rallidae	E	R	D
29	<i>Gallinula melanops</i>	pollona pintada	Rallidae	R	R	I-D

	Especie	Nombre común	Familia	Abundancia	Estacionalidad	Uso de la charca
30	<i>Jacana jacana</i>	jacana	Jacaniidae	E	R	D
31	<i>Himantopus melanurus</i>	tero real	Recurvirostridae	C	R	D
32	<i>Vanellus chilensis</i>	tero común	Charadriidae	C	R	P
33	<i>Tringa flavipes</i>	pitotoi chico	Scolopaeidae	E	M-B	D
34	<i>Gallinago paraguaiiae</i>	becasina común	Scolopaeidae	C	R	P-D
35	<i>Chroicocephalus maculipennis</i>	gaviota capucho café	Laridae	C	R	V
36	<i>Patagioenas picazuro</i>	paloma picazuro	Columbidae	C	R	V
37	<i>Zenaida auriculata</i>	torcaza	Columbidae	C	R	M
38	<i>Myiopsitta monachus</i>	cotorra	Psittacidae	C	R	M
39	<i>Guira guira</i>	pirincho	Crotophagidae	E	R	P
40	<i>Speotyto cunicularia</i>	lechucita vizcachera	Strigidae	E	R	P
41	<i>Tyto alba</i>	lechuza del campanario	Strigidae	C	R	I
42	<i>Colaptes campestris</i>	carpintero campestre	Colapidae	C	R	P
43	<i>Cinclodes fuscus</i>	remolinera común	Furnariidae	E	M-A	D
44	<i>Furnarius rufus</i>	homero	Furnariidae	C	R	D
45	<i>Phleocryptes melanops</i>	junquero	Furnariidae	C	R	D
46	<i>Phacellodomus striaticollis</i>	e. pecho manchado	Furnariidae	C	R	M
47	<i>Xolmis irupero</i>	monjita blanca	Tyrannidae	E	R	P
48	<i>Lessonia rufa</i>	sobrepuesto común	Tyrannidae	E	M-A	P-D
49	<i>Hymenops perspicillata</i>	pico de plata	Tyrannidae	E	R	P-D
50	<i>Serpophaga nigricans</i>	piojito gris	Tyrannidae	E	R	M
51	<i>Tachuris rubrigastra</i>	tachuri sietecolores	Tyrannidae	E	R	D
52	<i>Machetornis rixosus</i>	picabuey	Tyrannidae	C	R	M
53	<i>Satrapa icterophrys</i>	suiriri amarillo	Tyrannidae	E	R	M
54	<i>Pitangus sulphuratus</i>	benteveo común	Tyrannidae	C	R	P-D
55	<i>Tyrannus melancholicus</i>	suiriri real	Tyrannidae	C	M-R	M
56	<i>Tyrannus savana</i>	tijereta	Tyrannidae	C	M-R	P
57	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	churrinche	Tyrannidae	E	M-R	M
58	<i>Phaeoprogne tapera</i>	golondrina parda	Hirudinidae	C	M-R	P
59	<i>Tachycineta leucorrhoa</i>	golondrina ceja blanca	Hirudinidae	C	M-R	P-D
60	<i>Troglodytes aedon</i>	ratona común	Troglodytidae	C	R	M
61	<i>Mimus saturninus</i>	calandria grande	Mimidae	F	R	M
62	<i>Anthus correndera</i>	cachirla común	Motacillidae	C	R	P
63	<i>Anthus hellmayri</i>	cachirla pálida	Motacillidae	E	R	P
64	<i>Geothlypis aequinoctialis</i>	arañero cara negra	Parulidae	R	R	I-D
65	<i>Sicalis luteola</i>	misto	Emberizidae	C	R	P
66	<i>Sicalis flaveola</i>	jilguero dorado	Emberizidae	E	R	M
67	<i>Zonotrichia capensis</i>	chingolo	Emberizidae	E	R	D
68	<i>Ammodramus humeralis</i>	cachilo ceja amarilla	Emberizidae	R	R	P
69	<i>Embernagra platensis</i>	verdón	Emberizidae	C	R	P
70	<i>Carduelis magellanica</i>	cabecita negra común	Carduelidae	C	R	M
71	<i>Molothrus rufoaxillaris</i>	tordo pico corto	Icteridae	E	R	M
72	<i>Molothrus bonariensis</i>	tordo renegrido	Icteridae	C	R	P
73	<i>Agelaioides badius</i>	músico	Icteridae	C	R	M
74	<i>Agelastichus thilius</i>	varillero ala amarilla	Icteridae	C	R	D
75	<i>Pseudoleistes virescens</i>	pecho amarillo chico	Icteridae	A	R	D-P
76	<i>Leistes superciliaris</i>	pecho colorado	Icteridae	R	R	P
77	<i>Amblyrhynchus holosiriceus</i>	federal	Icteridae	R	R	Pajonal

Referencias:

Abundancia: R: Raro; E: Escaso; C: Común; A: Abundante.

Estacionalidad (establecida en aquellas especies en las que se conoce el estado): **MA:** Migrador austral (llega en invierno); **MB:** Migrador boreal (llega en verano y no nidifica); **MR:** Migrador residente (llega en verano y nidifica en el área); **R:** residente.

Uso de las charcas por parte de cada especie: **D:** usan directamente las charcas; **P:** usan los pastizales circundantes; **M:** usan las charcas o los pastizales marginalmente; **V:** pasan volando y no usan nada; **I:** indeterminado (y sus combinaciones).

Mamíferos: Los mamíferos considerados fueron registrados mediante observaciones directas en el área de estudio y sus alrededores, como producto de los muestreos realizados. En algunos casos (ratones) se encontraron ejemplares en trampas de caída utilizadas en el área de estudio con otros fines de investigación. Para confeccionar la lista de especies o inventario consideramos la presencia de al menos un individuo de cada especie en el área de estudio (Tabla 7).

Tabla 7 Lista de especies de mamíferos que habitan o frecuentan las charcas y sus alrededores, dentro del área de estudio

	Especie	Nombre común	Familia
1	<i>Chaetophractus villosus</i>	peludo	Dasypodidae
2	<i>Didelphys albiventris</i>	comadreja overa	Didelphidae
3	<i>Lutreolina crassicaudata</i>	comadreja colorada	Didelphidae
4	<i>Galictis cuja</i>	hurón	Mustelidae
5	<i>Conepatus chinga</i>	zorrino	Mustelidae
6	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	ratón de agua	Muridae
7	<i>Holochilus brasiliensis</i>	rata de agua	Muridae
8	<i>Akodon azarae</i>	ratón de campo	Muridae
9	<i>Oxymycterus rufus</i>	ratón hocicudo	Muridae
10	<i>Calomys laucha</i>	laucha de campo	Muridae
11	<i>Cavia aperea</i>	cuis grande	Cavidae
12	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>	Carpincho	Hydrochaeridae
13	<i>Myocastor coipus</i>	coipo, nutria	Myocastoridae
14	<i>Lepus europaeus</i>	liebre	Leporidae

3.5 Caracterización fisicoquímica del agua

3.5.a Introducción

A pesar de que vivimos en un mundo de agua y de que el agua es el componente más abundante de la corteza terrestre, las principales reservas se concentran en los océanos. En éstos se almacenan un 97,2% del total disponible en el ciclo exógeno, como agua salada. El agua dulce superficial de nuestro planeta es verdaderamente escasa. Sólo un 0,0001% está en ríos y arroyos, y un 0,009% en lagos de agua dulce, con tiempos de residencia de 14 días y decenas de años, respectivamente. El resto está almacenado en glaciares y casquetes montañosos (2,15%) o como agua subterránea (0,31%), con largos períodos de residencia. Finalmente, la atmósfera alcanza en su totalidad a contener un 0,001%, con hasta 9 días de tiempo de residencia estimado. (Botney y Keller, 2000) Su composición es muy variada y depende fuertemente del tipo de materiales por los que atraviesan los cursos. Sus características fisicoquímicas principales vienen definidas en función de los principales componentes mayoritarios inorgánicos (sodio, potasio, calcio, magnesio, carbonatos, sulfatos, nitratos, cloruros,

conductividad, pH) y orgánicos disueltos (sustancias húmicas), además de la fracción mineral inorgánica u orgánica en suspensión.

De manera global, la agricultura constituye la actividad que mayor cantidad de agua utiliza. Alcanza, en volumen del total utilizado, hasta 69%. Otros usos importantes del recurso son el industrial y el doméstico (Spiro y Stigliani, 2004). Los requerimientos específicos en calidad para diversos usos del agua han determinado el desarrollo de metodologías fisicoquímicas y biológicas para su caracterización y control. Existen en la actualidad, además de técnicas normalizadas para la determinación de parámetros de calidad, exigencias definidas por medio de legislaciones específicas, ya sea como límites admisibles o niveles guías referenciales. Ejemplos de manuales o compendios de métodos normalizados son los de Degremont (1978), AFNOR (1986), APHA (1998), ASTM (1994), entre otros. En lo referente a normativas, se fijan tanto para el suministro de agua para consumo humano con tratamiento convencional, como para protección de la vida acuática, para abrevado de ganado, para irrigación o para uso recreativo. En nuestro país existe un paquete normativo tanto a nivel nacional como para las provincias. En su reglamentación, incluye la protección de fuentes de provisión (algunos ejemplos son la Ley de la Provincia de Buenos Aires 5965 de protección de los cursos de agua y de la atmósfera; la Ley Nacional 24051 de residuos peligrosos que en anexos de su Decreto Reglamentario 831 incluye niveles guía de calidad para los diversos usos antes descriptos; la Ley de la Provincia de Buenos Aires 11820, con niveles de calidad para el suministro de agua potable y para las descargas vertidas a cuerpos de agua superficial).

Durante el desarrollo experimental de la tesis realizamos caracterizaciones de la calidad del agua en laboratorio y medición rutinaria en campo. A continuación detallamos estos parámetros medidos, así como también las técnicas empleadas y el instrumental utilizado para la medición y control de temperatura, turbidez y color, conductividad, dureza, pH, alcalinidad, oxígeno disuelto (OD), cationes y aniones mayoritarios, metales pesados y compuestos orgánicos contaminantes.

El presente ítem tiene como objetivos realizar una caracterización del agua de la región del arroyo El Pescado por medio de datos propios y otros tomados de la bibliografía, además de los análisis practicados sobre el agua de red utilizada en bioensayos de toxicidad de laboratorio.

3.5.b Metodología

Extracción de muestras: En el campo se tomaron muestras de agua y sedimento de ambos sitios de muestreo en diferentes periodos. También se registraron parámetros en campo con instrumentos para la medición de temperatura, pH, conductividad, oxígeno disuelto y turbidez. Los procedimientos de extracción y conservación de muestras para su posterior análisis en laboratorio se realizaron según recomendaciones del APHA (1998).

En el laboratorio se tomaron muestras de agua de red en distintos momentos, de agua filtrada, sin filtrar y reposada. También extrajimos muestras de agua recién salida de la canilla a distintas horas del día, dejándola correr para conocer o medir su variabilidad (producto de incorporaciones de hierro y plomo u otros compuestos que pudieran provenir de los materiales de la propia red de distribución del edificio).

Procedimiento analítico de laboratorio: Para su caracterización en laboratorio, las muestras de agua se extrajeron del sector subsuperficial de la charca, por triplicado, en botellas de vidrio y de polipropileno de 1L. Se trasladaron en frío al laboratorio y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento. Se emplearon técnicas estandarizadas para el análisis fisicoquímico de las aguas de acuerdo a procedimientos de rutina puestos a punto en el laboratorio (APHA, 1998). Los parámetros generales analizados fueron la dureza, alcalinidad, pH, amonio, nitritos, nitratos, fosfatos, además de metales y pesticidas. Los nutrientes se analizaron sobre alícuotas previo filtrado por filtros de papel Whatman 0,45 µm de tamaño de poro. Todas las mediciones efectuadas se procesaron el mismo día y los valores presentados fueron promediados.

Parámetros fisicoquímicos determinados en campo: La temperatura se tomó con un termómetro de mercurio con escala a la décima de grado. El pH, mediante sensor Luftman HORIBA con escala en unidades de pH, la conductividad en µS.cm, la turbidez en UNT y el oxígeno disuelto en mg/L.

Parámetros fisicoquímicos determinados en laboratorio: Una vez en el laboratorio, medimos la alcalinidad, dureza y sólidos totales de las muestras de agua recién colectadas, antes de su acondicionamiento y conservación en frío. Luego fueron filtradas y/o acidificadas para la medición de nutrientes y metales pesados. Los métodos indicados a continuación corresponden a APHA (1998); de lo contrario, se indica la fuente.

Alcalinidad: Por titulación ácido base de acuerdo al método Alcalinidad: método 2320, expresando los resultados en mg CaCO₃/L.

Dureza: Por titulación con EDTA de acuerdo al método 2340C, expresando los resultados en mg CaCO₃/L.

Nutrientes: Las muestras de agua fueron inmediatamente filtradas a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C y llevadas en frío al laboratorio para su análisis. La concentración de nutrientes disueltos se midió sobre las muestras de agua filtradas. El fósforo reactivo soluble se determinó por colorimetría de la reacción con molibdato-ascórbico y el nitrato más nitrito por reducción en columna de Cd y posterior diazotación siguiendo los métodos preconizados por Strickland y Parsons (1972). La concentración de amonio se determinó por el método del indo fenol azul, siguiendo la metodología propuesta por Mackeret *et al.* (1978). El Carbono Orgánico Total, mediante Pérdida por Ignición con medida gravimétrica; el Amonio por el método 4500-NH₃F de la sal de Fenol; los Nitratos: método 4500-

NO₃⁻E por reducción de Cadmio; los Nitritos por el método 4500-NO₂⁻B, colorimétrico; el Nitrógeno Kjeldahl Total por el método 4500-N_{org}C, semi-micro-Kjeldahl; el Fósforo Reactivo Soluble por el método 4500-PC, colorimétrico de ácido Vanadomolybdo-fosfórico; y el Fósforo Total por el método 4500-PC. Colorimétrico de ácido Vanadomolybdo-fosfórico, previa digestión ácida.

Metales pesados: Las muestras de agua filtradas fueron acidificadas con HNO₃ p.a. hasta pH <2, permaneciendo almacenadas en frascos plásticos hasta su procesamiento. Sobre las mismas se determinó el contenido de metales pesados disueltos utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian SpectrAA300) Absorción Atómica método 3111B Llama Directa de Aire-Acetileno, previa digestión con ácido nítrico, método 3030E.

3.5.c Resultados y conclusiones

Los parámetros de calidad de las charcas estudiadas y los correspondientes al agua de red de suministro al laboratorio, a dicha agua estacionada y filtrada utilizada en bioensayos y al agua reconstituida FETAX, se listan en las Tablas 8 y 9, respectivamente.

Tabla 8 Parámetros de calidad de aguas de sitios de estudio en campo. Los resultados corresponden al análisis sobre agua total, excepto el fósforo que se analizó sobre la fracción soluble

Parámetro de calidad	Sitio de muestreo				
	Charca A	Charca B	Charca Frisón	Arroyo El Pescado	Arroyo del Sauce
pH	6,4	6,7	6,9	7,8	7,0
Alcalinidad (mg CO ₃ Ca/L)	65,5	123,35	137,8	180,1	98,3
Dureza (mg CO ₃ Ca/L)	21,0	58,7	-	67,1	73,1
Nitritos (mg/L)	0,007	0,007	-	-	-
Nitratos (mg/L)	0,94	0,07	-	-	-
Fósforo RS (mg/L)	0,06	0,06	-	-	-
Fe (mg/L)	0,89	2,47	-	0,81	1,05
Mn (mg/L)	0,60	0,32	-	0,17	0,02
Cd (mg/L)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Cr (mg/L)	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Cu (mg/L)	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Pb (mg/L)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Zn (mg/L)	0,15	0,10	-	1,00	< 0,01

Estos resultados indican que el agua de las charcas es blanda, prácticamente neutra, con niveles de concentración de metales pesados minoritarios no detectables con las técnicas analíticas empleadas o cercanos a dicho límite. Los niveles de concentración de los dos metales más abundantes (Fe y Mn) están dentro de los valores esperables para la región. Mercado (2000) encuentra en tres sitios de muestreo sobre el arroyo El Pescado niveles de pH ligeramente más alcalinos, con una conductividad entre 250 y 690 µS/cm y niveles de nitrato y nitrito entre 0,19-

0,42 y 0,01-0,04 mg/L, respectivamente. Sin embargo, los niveles de fósforo reactivo soluble son casi un orden de magnitud inferiores en las charcas en comparación con el arroyo, teniendo en cuenta que la comparación se realiza en distintos momentos de muestreo. En comparación con otras cuencas de la región (Arroyo del Gato y arroyo Rodríguez), el arroyo El Pescado tiene aguas con menor contenido de sales disueltas (en función de la conductividad y contenido de iones mayoritarios) y nutrientes, asemejándose a las aguas del arroyo Juan Blanco (Mercado, 2000).

Tabla 9: Parámetros de calidad en agua de red, agua pretratada y agua reconstituida utilizada en ensayos de toxicidad

Parámetro de calidad	Agua red	Agua red estacionada y aireada	Agua Fetax
pH	6,8-7,7	7,7-8,0	8,0
Conductividad			
Alcalinidad (mg CO ₃ Ca/L)	74,2-95,4	49,1-84,8	65,5
Dureza (mg CO ₃ Ca/L)		121,6	109,0
Nitratos (mg/L)	10		
Fe (mg/L)	0,02-0,07	0,26	0,02
Cd (mg/L)	< 0,002	< 0,002	< 0,02
Cr (mg/L)	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Cu (mg/L)	< 0,02	< 0,02	< 0,01
Ni (mg/L)	< 0,01	< 0,01	-
Pb (mg/L)	0,02-0,06	0,02	< 0,02
Zn (mg/L)	<0,01	0,08	0,02

Con referencia al agua de ensayo, es más dura, de mayor alcalinidad, con mayor concentración de nitrato y menor de hierro. Tanto el agua de red estacionada como el agua reconstituida no difieren significativamente entre sí teniendo en cuenta los parámetros evaluados.

4 BIOLOGÍA DE LAS ESPECIES DE ANUROS ESTUDIADAS

Con la intención de generar información básica sobre la biología y ecología de las especies de anuros que componen la comunidad estudiada, particularmente sobre su biología reproductiva y el desarrollo de su fase larval, hemos realizado, a partir de la información derivada de los estudios de campo y laboratorio, una descripción de cada especie estudiada. A continuación consignamos las metodologías utilizadas en los estudios de campo y laboratorio.

4.1 Estudios en campo

4.1.a Introducción

El análisis de las comunidades animales, y en particular el modo en que las especies particionan los recursos ambientales, ha sido objeto de especial interés de los biólogos, fundamentalmente a partir de la década del '60, luego de que Hutchinson publicara, en 1959, el clásico artículo "*Homage to Santa Rosalía, or why are there so many kinds of animals?*". Fue a partir de ese momento que los ecólogos centraron su atención en el estudio de las diferentes formas en que las especies de una misma comunidad utilizan los recursos (Basso, 1990).

Durante las décadas siguientes –'70 y '80– este tipo de estudios tuvo un gran desarrollo, principalmente en las distintas zonas tropicales húmedas, debido a su gran diversidad y abundancia (Duellman, 1970; 1978; Crump, 1974; Heyer, 1969, 1973, 1975, 1976; Inger y Colwell, 1977; Toft y Duellman, 1979; Toft, 1982; Jones, 1982). El estudio de las comunidades de anuros de las zonas templadas de América del Sur tuvo un desarrollo mucho menor. En tal sentido, sólo pueden mencionarse los artículos de Gallardo, 1970, 1976, 1980; Martori *et al.* 1983; Gudynas y Rudolf, 1987 y Basso, 1990.

A fines de la década del '80, se realizó el Primer Congreso Mundial de Herpetología, en donde empezó a ser una preocupación para los herpetólogos el gran número de casos en los que distintas especies de anuros comenzaban a disminuir sus poblaciones y hasta desaparecer en varios lugares del planeta.

A partir de ese momento se desarrollaron varios talleres y reuniones con el objetivo de averiguar si la declinación de anfibios era un hecho global. En estos talleres se resolvió constituir grupos de trabajo, entre los que se encuentra el *Declining Amphibian Populations Task Force* (DAPTF). Este grupo impulsó el desarrollo de metodologías estandarizadas y protocolos para muestrear poblaciones naturales de anfibios, lo cual generó un aumento del número de trabajos publicados y proyectos que intentan contribuir al conocimiento de la diversidad de anuros de las distintas regiones del mundo, su estado de conservación y distintos aspectos de su ecología.

4.1.b Metodología

Las campañas y los 248 muestreos realizados en el presente trabajo de tesis entre enero de 1998 y diciembre de 2004 se diseñaron sobre la base de las técnicas de monitoreo propuestas por Heyer *et al.*, 1994.

Dentro del diseño de muestreo se aplicaron las siguientes técnicas: Muestreo de Relevamiento Sistemático (*Systematic Sampling Survey* -SSS); Relevamiento por Encuentros Visuales (*Visual Encounter Survey* - VES); Transectas de Bandas

Auditivas (*Audio Strip Transect* - AST); Muestreo por Transectas (MTR); Relevamiento de Lugares de Reproducción (RLR); Muestreo Cuantitativo de Larvas de Anfibios (MCL) y Cercas de Línea Recta y Trampas de Pozo (CTC).

Sin dejar de considerar los diversos requerimientos que plantea la aplicación de las técnicas de muestreo seleccionadas, y con el objetivo de simplificar su descripción, agrupamos las actividades realizadas en campo en dos clases:

Muestreos diurnos: Durante las horas de luz se realizaron actividades asociadas con el monitoreo de poblaciones de anuros adultos (SSS, VES, AST, MTR, RLR y CTC), y se relevó el área de estudio, intensificándose la búsqueda de huevos y larvas en los cuerpos de agua y de adultos en sus refugios. También se realizó el relevamiento de otras taxocomunidades, la toma de datos sobre los cuerpos de agua (características morfológicas de los mismos y parámetros fisicoquímicos del agua), y características del suelo y clima.

Se realizaron los Muestreos Cuantitativos de Larvas de Anfibios (MCL) y el monitoreo de poblaciones larvales. Para la captura de los renacuajos se utilizaron copos de mano de 20 cm de diámetro y 1 mm de poro y cada muestra se tomó de modo aleatorio siguiendo el diseño experimental. Las larvas colectados fueron medidas en el lugar con un calibre vernier de 0,05 mm de precisión y luego devueltos al ambiente en los MCL, o fueron fijados en solución de formaldehído al 10% para su posterior estudio en laboratorio.

Muestreos nocturnos: En general, el momento más apropiado para realizar los muestreos de anuros adultos fue desde el atardecer hasta dos o tres horas después de la medianoche, dado que este período abarca el pico de actividad de canto de la mayoría de las especies de la taxocomunidad. Durante este período se realizaron muestreos extensivos con las técnicas SSS, VES y AST, con el objetivo de detectar actividad reproductiva y pruebas sonoras de la presencia de especies ocultas en sus refugios.

Por otra parte, durante las épocas de mayor actividad (septiembre-noviembre y febrero-abril) además de lo anteriormente mencionado, se realizaron en cada campaña muestreos sistematizados por transectas (MTR, RLR y CTC). Los MTR se realizaron en cada una de las charcas, estableciéndose como número de muestra 3 transectas por charca. Cada charca se dividió en sectores y se trazaron 15 transectas fijas en cada una, las cuales eran escogidas por sorteo.

Toda la información proveniente de las distintas técnicas aplicadas fue asentada en planillas *in situ* y luego ingresada a una base de datos. Con la información registrada se confeccionó una matriz (matriz biológica de datos), para poder analizar las variables medidas con diferentes herramientas estadísticas.

En primer lugar, se realizaron análisis estadísticos descriptivos, estableciéndose los rangos de variación para los distintos parámetros analizados. Posteriormente, con la matriz biológica se efectuaron análisis exploratorios, mediante la aplicación

de las técnicas multivariadas de Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis de Agrupamientos (AA), a fin de conocer la variabilidad conjunta de los datos obtenidos y el aporte de cada variable a los distintos componentes. Finalmente, y con el objetivo de ver la influencia de los factores ambientales sobre la actividad reproductiva de cada una de las especies de anuros de la comunidad estudiada y en qué magnitud afectan su actividad reproductiva, esta matriz biológica fue utilizada para realizar un Análisis de Correspondencia Canónica (ACC) junto con la matriz ambiental generada a partir de los muestreos en campo. Esta información, una vez procesada, fue interpretada e incorporada a la descripción de la biología de cada especie.

4.1.c Resultados de los estudios de campo

Con la información obtenida a partir de la aplicación de las metodologías antes descritas (SSS, VES, AST, MTR, RLR, MCL y CTC) se confeccionó un inventario de especies, presentado en el ítem 4.4.b₂ “Descripción faunística de las charcas y la zona de estudio: Anfibios”. La abundancia relativa de las especies en cada ambiente a lo largo del tiempo se estimó a partir de VES, AST, MTR, RLR y MCL, lo que permitió hacer el análisis de las variaciones de la actividad reproductiva de cada especie a lo largo del período de estudio, en toda el área, en cada charca y efectuar comparaciones entre las mismas. Estas técnicas también permitieron determinar la composición de agrupaciones de anuros en el área de estudio y obtener información sobre el uso del hábitat. Si bien esta información fue cuantificada y analizada estadísticamente, los resultados de estos análisis no se presentan en detalle y su interpretación es incluida en la descripción de la biología de cada una de las especies estudiadas (ver ítem 4.3, más adelante).

Los estudios de las larvas en campo (RLR y MCL) permitieron, además de confirmar la reproducción de distintas especies y aproximar con mayor exactitud los intervalos reproductivos, generar información sobre las condiciones naturales en las que se desarrollan las larvas de las diferentes especies de anuros, así como realizar observaciones de investigación para diseñar ensayos biológicos y ecotoxicológicos en laboratorio y campo. Los resultados de estos estudios, fueron incorporados a la descripción de la biología de las especies estudiadas en el ítem 4.3, mencionado en el párrafo anterior.

4.2 Estudios en laboratorio

4.2.a Introducción

Si bien no detallaremos los resultados obtenidos a lo largo del período de estudio en relación con la manutención, cría y reproducción de anuros adultos en laboratorio, esta información fue incorporada como parte de la experiencia previa utilizada en el momento de toma de decisiones para el diseño y planificación de

los experimentos. En este ítem nos referiremos propiamente a los estudios de laboratorio realizados sobre la etapa larval de las especies de anuros estudiadas.

Como se mencionó en el Capítulo I (ítem 1.1.h) el estudio de las larvas en Argentina ha sido abordado sólo en algunos aspectos y en una pequeña proporción de especies. Por esta razón, a la hora de diseñar estudios bioecológicos sobre larvas de anuros, no se encuentra disponible en la literatura la información necesaria para poder afrontar investigaciones que posean un sólido diseño experimental. Las especies de la comunidad estudiada son conocidas. En muchos casos su larva está descripta morfológicamente desde hace años y se pueden encontrar relatos sobre algunos aspectos biológicos, (Fernández *et al.*, 1927; Gallardo, 1974, 1987 a-b; Gallardo *et al.*, 1992), además de comentarios breves sobre características de las puestas y hábitos o historias de vida (Ceí, 1980). Sin embargo, nos hemos encontrado con falta de información acerca de la magnitud y el rango de variación de los factores que se sabe influyen sobre el normal desarrollo de los renacuajos. Estos conocimientos son necesarios para diseñar experimentos bioecológicos y/o toxicológicos. Entre ellos podemos mencionar algunos factores relacionados con la actividad reproductiva que fueron abordados en el ítem 4.1: “Estudios en campo”: época del año en que se reproducen, forma de las puestas, número de huevos por puesta. Lo mismo ocurre con los factores fijos⁴ o controlables en laboratorio, cuyos rangos óptimos es necesario conocer para poder criar o lograr el normal desarrollo de las larvas: características fisicoquímicas del agua, temperatura, fotoperíodo, volumen de agua, profundidad y superficie de los acuarios, densidad, alimentación (tipo y cantidad). Finalmente mencionaremos los tiempos en que los distintos procesos fisiológicos se desarrollan en condiciones controladas, lo que implicaría parámetros como tasa de desarrollo, tasa de crecimiento y duración del ciclo larval. Esta información es de mucha utilidad para responder preguntas de primer orden a la hora de diseñar experimentos, como por ejemplo qué tipo de recipiente utilizar, cuántos individuos poner por frasco o cuánto tiempo extender la experiencia, entre otras.

El objetivo del presente ítem es generar información básica sobre los modos de obtención de huevos, el desarrollo del ciclo larval completo bajo condiciones controladas de laboratorio y el efecto que ejercen los diferentes niveles de los factores dentro de las condiciones controladas del laboratorio, sobre la tasa de crecimiento, la tasa de desarrollo, la supervivencia y el tiempo a la metamorfosis, con la finalidad de emplear esta información en el diseño de posteriores bioensayos viables en laboratorio.

⁴ Utilizamos la denominación introducida por Eisenhart (1947) “*fixed-effects and random-effects*”, “*Model I*” y “*Model II*” para el análisis de la varianza, utilizada más tarde por Zar, 1999.

4.2.b Metodología

4.2.b₁ Obtención de huevos

La obtención de huevos se realizó por medio de tres métodos que describimos brevemente a continuación. Las adaptaciones de estas metodologías a la biología de cada especie se comentarán en el ítem 4.3: “Resultados, interpretación y conclusiones sobre la biología de las especies estudiadas: huevos y larvas”.

Método A - “colecta de amplexos”: Se obtuvieron parejas en amplexo en el campo, se trasladaron inmediatamente al laboratorio y se colocaron en acuarios o terrarios acondicionados para que la oviposición se produjera de la forma más natural posible. El acondicionamiento consistió básicamente en colocar agua de ensayo, manteniendo las profundidades que se hallaban en el campo en recipientes seleccionados según el tamaño y estrategia reproductiva de la especie capturada, con el agregado de algún soporte para que los individuos no se ahoguen y plantas acuáticas como sustrato para la colocación de los huevos.

Consideraciones sobre el método: Este método es utilizable con todas las especies de anuros estudiadas. Con las especies de pequeño y mediano tamaño, los amplexos deben colocarse, tratando de producir la menor perturbación posible, en frascos de vidrio de 2,8 L de capacidad, con tapa de red. Dentro del frasco debe agregarse previamente medio litro de agua de la charca y unas ramitas de la vegetación presente en el lugar, con el propósito de brindarles soporte para sostenerse y un sustrato donde adherir los huevos. El frasco con el amplexo formado debe colocarse en un sitio resguardado y tranquilo hasta verificar la presencia de huevos (lo que ocurre generalmente en el transcurso de unas horas). Esta metodología fue aplicada en general en todas las especies de la familia *Hylidae* y en *Pseudopaludicola falcipes*. Las especies de mayor tamaño, que colocan sus huevos en forma individual dispersos por el fondo, deben trasladarse rápidamente al laboratorio, donde se ubican en terrarios, peceras o tanques previamente acondicionados, de gran superficie y volumen. En los mismos deben colocarse entre 10 y 30 cm de agua, según el tamaño de la especie tratada y algún tipo de soporte (piedras o troncos u otro material inerte) para permitir a las hembras descansar o tener un lugar en donde permanecer fuera del agua. En el caso de los bufónidos y de las especies de leptodactílidos que construyen nidos de espuma (ya sea flotantes o escondidos en cuevas) se prefirió utilizar el método D, descrito más adelante (“recolección directa de puestas”).

Método B - “inducción artificial”: Se obtuvieron adultos, se mantuvieron y aclimataron en laboratorio por períodos prolongados, y posteriormente se realizó una inducción artificial de la puesta. Este método consistió en la imitación artificial de las condiciones climáticas en laboratorio, principalmente Fotoperíodo, Temperatura, Alimentación, Disponibilidad de agua, Lluvias intermitentes (generadas por medio de un sistema automatizado de bombas circuladoras de agua, un depósito de agua y un *timer*) y reproducción de canto (reproducción de grabaciones

realizadas en campo por medio de un grabador de cinta magnetofónica sincronizado mediante un *timer* con la imitación de lluvias).

Método C - “inducción hormonal”: Se obtuvieron adultos, se mantuvieron y aclimataron en laboratorio por períodos prolongados, y posteriormente se realizó una inducción artificial por métodos estandarizados, que consisten básicamente en inducir la reproducción, mediante inyecciones de Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG). El método contempla dos opciones: Opción a) se deja luego de la inducción que se produzca el amplexo y la fecundación por parte de la pareja. (Bantle, 1990), Opción b) una vez detectada la ovulación en la hembra por pérdida de óvulos, se procede a realizar la fecundación artificial, mediante la extracción de óvulos de la hembra y fecundación manual, utilizando un pincel, con el que se aplica el macerado de testículos obtenido a partir del macho estimulado (Castañe *et al.*, 1987, Salibián, 1992, Herkovits y Perez-Coll, 1999a y b).

Método D - “recolección directa de puestas”: Este método se utilizó cuando se encontraron puestas recién colocadas en el ambiente. Una vez detectada e identificada la puesta se procede, provocando la menor perturbación posible, a introducirla, junto con el agua circundante y el soporte vegetal, dentro de una bolsa de polietileno para su posterior traslado al laboratorio.

Consideraciones sobre el método: Sólo es utilizable con las especies que colocan sus huevos en masas, nidos o cordones perfectamente individualizables. En el caso de las especies del género *Bufo*, si bien se puede emplear la técnica “cosecha de amplexos” anteriormente descrita, cuyo objetivo es obtener huevos procedentes de un mismo amplexo, este mismo objetivo se puede lograr esperando que la pareja de amplexo coloque sus huevos, que son abundantes y fácilmente individualizables. La recolección de huevos por este método puede atribuirse con certeza a la misma puesta. Los leptodactílidos que colocan los huevos en nidos de espuma poseen esta misma particularidad, ya que los nidos de espuma, si bien pueden estar agrupados, son fácilmente individualizables uno de otro; por lo tanto, puede localizarse el par en amplexo y esperar a que terminen de construir el nido de espuma.

4.2.b₂ Ciclos en laboratorio

Para la obtención de ciclos larvales completos en condiciones de laboratorio, se procedió a la sistematización de la metodología de obtención, traslado, manutención de puestas y posterior desarrollo de larvas en laboratorio, contemplando el amplio espectro de requerimientos de las distintas larvas de las especies que habitan el área de estudio. De manera general, se establecieron los requerimientos mínimos para mantener larvas en laboratorio, utilizando la información disponible e incorporando la experiencia obtenida hasta el momento en la cría y el mantenimiento de larvas, además de conocimientos normalizados de acuarismo. Las condiciones generalizadas se detallan en la Tabla 10.

Una vez en el laboratorio, las puestas eran acondicionadas, contado el número de huevos, identificadas con un número y colocadas en bateas plásticas de 45 L de capacidad con agua de ensayo para su aclimatación. A cada acuario se le colocó aireación continua abastecida por una bomba de aire y cuando los renacuajos llegaban al estadio 25 de Gosner (1960), se le suministraba lechuga licuada *ad libitum*, a modo de alimento, la que era renovada regularmente junto con el acondicionamiento del acuario.

Según el número de huevos por puesta, se planificó una serie de extracciones a lo largo del ciclo, con un número determinado de individuos por extracción (generalmente 5), que eran fijados en solución de formaldehído al 10% para posteriores registros de longitud, peso y estadio de desarrollo. Los individuos fijados eran individualizados, numerados e ingresados en una base de datos. Los datos obtenidos de las mediciones fueron utilizados para estimar los tiempos de crecimiento y desarrollo de cada especie mantenida en el laboratorio. Este procedimiento se efectuó con todas las puestas colectadas en campo que se llevaron al laboratorio, llegando a obtenerse 100 ciclos de 15 especies

Tabla 10 Condiciones controladas de laboratorio y materiales empleados en los diferentes experimentos realizados

Factor	Valor (Nivel del factor)
Laboratorio:	
Temperatura	25°C
Fotoperíodo	16:8 (luz/oscuridad)
Tipo de iluminación	Tubos fluorescentes 40W
Intensidad de luz	21 [18-23] $\mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
Recipientes de ensayo:	
Material	Polipropileno/vidrio
Transparencia/opacidad	transparentes
Volumen	500 ml/2800 ml
Superficie	95cm ² /150 cm ²
Agua:	Agua de red declorinada (ver propiedades fisicoquímicas en Tabla 9)
Mantenimiento:	
Aireación	Constante (80-100 bur/min)
Alimentación	Lechuga licuada, 2ml/ recipiente con 5 individuos
Acondicionamiento/recambio	Cada siete días, cambio de medio.

4.2.b₃ Estudios bioecológicos

Los experimentos realizados con larvas en laboratorio formaron parte de una serie de experiencias preliminares realizadas con el objetivo de contrastar hipótesis simples acerca de los factores que influyen sobre el normal desarrollo de los renacuajos y conocer en qué magnitud inciden sobre la tasa de crecimiento, desarrollo y supervivencia de las larvas de anuros de las distintas especies estudiadas. El propósito final fue la aplicación de resultados al diseño de bioensayos de toxicidad (Capítulo IV).

Estos experimentos tuvieron en común las condiciones de laboratorio establecidas (fijas) que se mantuvieron constantes durante todo el período de estudio. Estas condiciones se presentan en la Tabla 10. Las especies con las que se realizaron, junto con los factores y sus diferentes niveles que se emplearon en los distintos diseños experimentales desarrollados, se resumen en la Tabla 11 de la página siguiente. Sólo se variaron los factores a evaluar (especificados en esta tabla).

En todos los casos se empleó el mismo procedimiento: los huevos se obtuvieron a partir del método denominado “colecta de amplexos” (método A) descrito en el ítem 4.2.b₁. Una vez obtenida la puesta, los huevos fueron aclimatados y mantenidos en condiciones de laboratorio (Tabla 9) hasta que alcanzaron el estadio 25 de desarrollo. Llegado ese momento fueron dispuestos aleatoriamente en los recipientes de ensayo según el diseño experimental. Las mediciones de las variables de repuestas, el cambio de medio y el agregado de alimento se realizaron una vez por semana. Según el diseño experimental o los requerimientos de las distintas etapas del experimento, se adicionaban tareas relacionadas con la revisión de individuos muertos y su remoción de los recipientes, agregado de alimentación, retiro de individuos metamorfoseados, observaciones de comportamiento y tareas de mantenimiento y control en general.

La duración de los distintos ensayos dependió de la especie estudiada. El requerimiento mínimo fue el tiempo de metamorfosis del primer individuo de la puesta, pero en otros casos se esperó a que todos los individuos completaran su metamorfosis.

La metodología estadística asociada con la resolución de los diseños experimentales consistió en la realización de pruebas de significancia entre los diferentes niveles de los factores evaluados. Para el caso de dos niveles de un factor se utilizó la prueba de *t* para diferencias de medias; en el caso de más de dos niveles, ANOVA simple, y cuando se evaluaron dos factores con sus respectivos niveles (tratamientos), ANOVA de dos factores. En todos los casos se comprobaron los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad de los datos, utilizando la prueba de Barlett y la prueba de bondad de ajuste (Chi cuadrado) respectivamente. En todos los casos se utilizó un nivel de significancia de 0,05 y las pruebas a posteriori de Tukey y Dunnett (Zar, 1998).

4.2.c Resultados

4.2.c₁ Obtención de huevos

La obtención de huevos mediante el método denominado “colecta de amplexos”, resultó ser el más eficiente, ya que su efectividad superó el 90%. El método de “inducción artificial” de la reproducción sólo se aplicó dos veces –una con *H. pulchellus* y otra con *Scinax squalirostris*–, ambas exitosamente, por lo que suponemos que puede ser útil para las restantes especies estudiadas. Este último método, al igual que el de “inducción por hormonas”, presentan la dificultad de que, además de la obtención de adultos de ambos sexos y de la infraestructura necesaria para su realización, exigen el mantenimiento de los ejemplares adultos en condiciones óptimas por períodos prolongados antes de la inducción. Debido al éxito obtenido al utilizar el método de “colecta de amplexos” durante el transcurso de la investigación, la utilización de las demás metodologías quedó relegada a los momentos en que era estrictamente necesaria.

Tabla 11 Resumen de los experimentos bioecológicos realizados en condiciones controladas de laboratorio

Especie	Factor	Niveles	Referencias
<i>Bufo fernandezae</i>	Alimentación	lechuga licuada hervida y alimento balanceado para peces	Natale y Bulus Rossini, 1996
<i>H. pulchellus</i>	Volumen de agua	250, 500, 750 y 1000 ml de agua por recipiente de vidrio de 2,8L de capacidad.	Negrin <i>et al.</i> , 1999
<i>H. pulchellus</i>	Número de renacuajos por recipiente	5, 10 y 15 renacuajos por recipiente de vidrio de 2,8L de capacidad.	Negrin <i>et al.</i> , 1999
<i>Odontophrynus americanus</i>	Alimentación	hojas de lechuga hervida, alimento balanceado para peces, hojas de pasto hervidas.	Cajade y Natale, 2002
<i>O. americanus</i>	Superficies del recipiente y Número de renacuajos por recipiente	255 y 415 cm ² 5, 15 y 30	Ammassari <i>et al.</i> , 2002 Ammassari <i>et al.</i> , 2002
<i>H. pulchellus</i>	Cantidad de alimento	0.02, 0.08, 0.32 g/ind. y “ <i>ad libitum</i> ”	Inédito
<i>H. pulchellus</i>	Aireación	sin aireación, con poca (10-20 burbujas por minuto), con mucha aireación (80-100 burbujas por minuto)	Inédito
<i>H. pulchellus</i>	Temperatura	20, 25, 30 (°C)	Inédito

El método de “inducción hormonal”, como mencionamos anteriormente se encuentra estandarizado para *Bufo arenarum* y *Xenopus laevis*. Nuestros resultados con *X. laevis* fueron exitosos en las tres oportunidades que lo empleamos, pero no resultó su aplicación con *Ceratophrys ornata* en dos intentos. Este método presenta como desventaja, además de las anteriormente señaladas, el tratamiento hormonal mediante inyecciones de los ejemplares y, en algunos casos, su sacrificio (el macho en primer lugar, para la obtención de esperma y, en caso de que la ovulación no sea completa, el sacrificio de la hembra para poder fecundar los óvulos que no fueron expulsados), situación a la que no hemos querido llegar. Una alternativa menos cruenta es la formación de amplexos de manera natural luego de la inducción hormonal por inyecciones de Endocorion®.

Un método muy eficiente y alternativo fue el de la “recolección directa de puestas”. Esta forma de obtención de huevos se utilizó en el caso de los leptodactílicos que construyen nidos de espuma y en algunos casos de las especies del género *Bufo*. Es un método muy sencillo cuya dificultad consiste en que requiere la detección de actividad reproductiva en el campo, la localización de amplexos y su seguimiento hasta la finalización de la postura, para luego proceder a su recolección y posterior traslado al laboratorio. Este método fue utilizado en el caso de encontrar puestas recién colocadas en el ambiente.

4.2.c₂ Ciclos en laboratorio

Los requerimientos mínimos establecidos para mantener larvas en laboratorio, resultaron de gran utilidad, permitiendo mantener desde el huevo hasta su metamorfosis a todas las especies de anuros estudiadas, con excepción de dos – *Dendropsophus sanborni* y *Ceratophrys ornata* –, que necesitaron de un suplemento alimentario más específico. De todas las especies estudiadas se obtuvieron ejemplares de renacuajos en cuatro etapas de su desarrollo larval. Esto permitió, además de generar una colección de material de referencia (Tabla 11 con especies vs. estadios fijados), obtener información sobre los distintos parámetros ecológicos a estimar en experimentos de laboratorio: tasas de supervivencia, tasa de desarrollo, tasa de crecimiento, tiempo a la metamorfosis y tamaño de los individuos a la metamorfosis. Estos resultados se detallan en la descripción de la biología de cada especie que se presenta en el ítem 4.3.

4.2.c₃ Estudios bioecológicos

De los diferentes experimentos realizados se obtuvieron los resultados que se detallan a continuación. Al evaluar el tipo de alimentación, se obtuvieron diferencias significativas en las tasas de crecimiento y en las tasas de desarrollo ($p < 0,05$) entre los renacuajos alimentados con diferentes alimentos, suministrados en cantidades equivalentes, en las dos especies estudiadas (*Bufo fernandezae* y *Odontophrynus americanus*). Las tasas de crecimiento y desarrollo fueron en ambos casos mayores en los grupos alimentados con alimento balanceado para peces (escamas Tetra®), que en los grupos alimentados con lechuga y pasto hervidos. La cantidad de alimento suministrada también resultó de importancia en

los experimentos realizados con *H. pulchellus*, presentando diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las tasas de crecimiento y desarrollo de los renacuajos alimentados con las diferentes raciones ofrecidas 0,02, 0,08, 0,32 g/ind y *ad libitum* ($> 0,32$). Los individuos expuestos a mayores concentraciones de alimento presentaron mayores tasas de crecimiento y desarrollo, pero en las dos concentraciones mayores (0,32 g/ind. y *ad libitum*) la supervivencia resultó significativamente menor ($p < 0,05$) que en los dos grupos a los que se ofrecieron menores raciones de alimento (0,02 y 0,08 g/ind.) a lo largo de todo el experimento.

Nuestra experiencia con el alimento balanceado en escamas para peces nos indica que el agua de ensayo se enturbia rápidamente llegando a condiciones anaeróbicas y muy inestables desde el punto de vista sanitario, a pesar de mantener una aireación enérgica y constante. Posiblemente esto se deba a la gran proporción de materia orgánica de origen animal que contiene este tipo de alimento. Estos resultados brindaron evidencias para decidir que si bien el alimento balanceado para peces presenta beneficios en el aumento de la tasa de crecimiento y desarrollo en las proporciones ensayadas, a la hora de realizar diseños en los que el alimento necesita estar en altas concentraciones como para considerarlo excesivo, el uso de alimento balanceado no es apropiado. En estos casos fue preferible utilizar la lechuga licuada. Si bien los renacuajos alimentados de este modo presentan tasas de crecimiento menores que los alimentados con Tetra®, nos permite llevar a cabo diseños experimentales en los que se evita la competencia por el recurso alimentario al colocar raciones excesivas, sin causar aumentos en las tasas de mortalidad.

Los resultados de la evaluación del número de individuos por recipientes y el volumen de agua a utilizar mostraron, para renacuajos de *H. pulchellus* (Negrin *et al.*, 1999) que pequeñas variaciones en los volúmenes y las densidades afectan de manera significativa las tasas de crecimiento, desarrollo y supervivencia ($p < 0,05$) de los renacuajos criados en las diferentes combinaciones de densidades. La combinación más beneficiosa, según los resultados de esta experiencia, fue la de 10 individuos cada 1.000 ml de agua, en recipientes de vidrio de 2,8 L de capacidad y una superficie de 150 cm².

La influencia de la superficie de los recipientes sobre la tasa de crecimiento, desarrollo y supervivencia de renacuajos de *Odontophrynus americanus*, evaluada conjuntamente con el efecto del número de individuos por recipiente (Ammassari *et al.*, 2002) no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) para ninguna de las variables de respuesta medidas. Por el contrario, y siguiendo el comportamiento observado en los experimentos realizados con renacuajos de *H. pulchellus*, sí existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los renacuajos criados en los recipientes con 5, 15 y 30 congéneres. Los individuos criados en densidades de 5 individuos cada 2000 ml presentaron tasas de crecimiento, desarrollo y supervivencia mayores.

Estos resultados, junto con los obtenidos de distintos trabajos de ecología experimental con renacuajos, han servido como base para diseñar los experi-

mentos con larvas de anuros, sometidos a contaminantes (bioensayos), una de las herramientas fundamentales utilizadas en este trabajo de tesis.

4.3 Resultados, interpretación y conclusiones sobre la biología de las especies estudiadas

De los resultados obtenidos a partir de los estudios realizados en campo y laboratorio intentaremos realizar una descripción de la biología de cada una de las especies estudiadas.

Consideraciones sobre los criterios utilizados:

Las siguientes descripciones se realizaron siguiendo los lineamientos generales de Fernández, (1927); Gallardo (1974, 1987 a-b), Gallardo *et al.*, 1992 y Ceí. (1980). Principalmente los de Ceí, siendo importante aclarar que en gran parte, la información volcada fue generada a partir de la investigación realizada en campo y laboratorio.

El presente trabajo se basa en las clasificaciones utilizadas por Ceí (1980) y su posterior actualización (Lavilla y Ceí, 2001). Para la Familia *Hylidae* adoptamos los cambios taxonómicos recientemente propuestos por Faivovich *et al.* (2005).

De la misma manera, las clasificaciones del estado de conservación fueron obtenidas a partir de la categorización de anfibios (Lavilla *et al.*, 2001, Lavilla y Ceí, 2002).

Familia *Hylidae* (Rafinesque 1815)

La familia *Hylidae* reúne ranas arborícolas o trepadoras de forma deprimida, con ojos prominentes y dedos aplanados terminados en discos adhesivos. Los machos presentan antebrazos un poco más robustos que las hembras. Poseen una gran gama de coloraciones y su piel dorsal es fina y lisa, pudiendo presentar granulaciones en mayor o menor grado. Su coloración ventral es generalmente clara, con gránulos glandulares de diferentes tamaños. Se alimentan principalmente de invertebrados pequeños, artrópodos e insectos, en especial dípteros. En Argentina existen 39 especies de esta familia, repartidas en 3 subfamilias y 10 géneros. De éstas, sólo 8 especies habitan la provincia de Buenos Aires.

Algunas especies son comunes en zonas rurales y periurbanas, en las proximidades o en el interior de construcciones (casas, galpones, especialmente baños o lugares que contengan tanques, piletas o reservorios de agua). A esto lo denominaremos hábito domiciliario.

Subfamilia *Hylinae* (Rafinesque, 1815)

Género *Dendropsophus* (Fitzinger, 1843)

Son formas de pupila horizontal, tímpano bien distinguible, dedos terminados en discos adhesivos, falanges terminales en forma curvada y hocico corto,. Las especies del género *Dendropsophus* que habitan la provincia de Buenos Aires (2 especies) están dentro del grupo *Dendropsophus microcephalus* (ranas de cabeza pequeña), todas formas de pequeño tamaño.

Dendropsophus nanus (Boulenger, 1889) (ranita del zarzal enana)

Rana arborícola de tamaño pequeño (LT = 18-23 mm) [machos: 18-23 mm; hembras: 20-22 mm].

Descripción: Cabeza grande. Hocico triangular, elongado y estrecho en su extremo, con narinas laterales que no sobresalen. Región loreal levemente cóncava y casi vertical. Párpados opacos que no permiten ver la pupila. Tímpano poco visible. Piel dorsal lisa, sin glándulas evidentes. Patrón de coloración homogéneo, color arcilla, a veces con bandas marrón oscuro a lo largo del cuerpo. No posee líneas glandulares. Puede presentar líneas longitudinales oscuras y sinuosas. Canto rostral, ojo y narina marcados por una banda lateral que en algunos casos se continúa hasta la ingle. Zonas inguinal, axilar y cara interna del fémur con reticulados naranja-rojizos brillantes (coloración *flash*). Antebrazo y tibia acordes al patrón de coloración general. Vientre y región postcloacal densamente granulares y de color blanco o blancuzco. Miembros estilizados con discos adhesivos redondos. Pies con membrana interdigital hasta la mitad de los dedos. Los machos presentan un saco vocal simple, externo y medio, de color amarillo.

Canto: El canto nupcial suena como un “gick, gick, gick, gick...” muy enérgico. El canto de lluvia es emitido cuando hay alta humedad relativa. En época de reproducción se identifican claramente interacciones (combates) entre machos, que al aproximarse demasiado varían su canto prolongándolo como un chirrido. Puede oírse desde lejos, a distancias medias de entre 100 y 300 m.

Ambientes en los que habita: En la provincia de Buenos Aires en el delta e islas asociadas con la franja costera parano-platense. En los alrededores de charcas permanentes y semipermanentes situadas en la zona de influencia de estos ríos. En ambientes someros colmados de juncos (*Schoenoplectus*), totoras (*Typha*) y lirios (*Iris*), o bien en ambientes formados en remansos de arroyos, muelles y canales aliviadores, con una densa carpeta vegetal de especies flotantes como los camalotes (*Pontederia*, *Nymphoides*, *Eichhornia*), lentejas de agua (*Lemna*, *Spirodela*), repollitos de agua (*Pistia*), cucharita de agua (*Limnobium*) o helechitos de agua (*Azolla*, *Salvinia*). Se la encuentra oculta en plantas que proveen refugio húmedo, siendo frecuente hallarlas en formaciones de *Eryngium*. En época reproductiva se encuentra asociada a la vegetación flotante, desde donde canta y se oculta durante el día.

Períodos de actividad: Principalmente durante primavera-verano (septiembre-febrero), con picos más marcados en noviembre, diciembre y enero. Durante la mayor parte del año permanece oculta.

Reproducción: Hacia fines de la primavera y durante todo el verano, continuando cuando los cuerpos de agua comienzan a secarse. Los machos cantan preferentemente de noche, sobre la vegetación flotante y emergente, formando coros numerosos. Luego de un pico reproductivo marcado, la actividad disminuye, pero continúa durante un tiempo prolongado con pocos machos cantando en baja densidad. Los amplexos se sujetan de tallos u objetos flotantes y se sumergen para colocar huevos en pequeñas masas adheridas a la vegetación sumergida.

Puesta: Entre 100 y 300 huevos agrupados en cordones muy entremezclados formando pequeñas masas adheridas a la vegetación sumergida dentro de los 10 cm superficiales de la columna de agua. Embriones de color marrón a negro. Tiempo de eclosión sujeto a la temperatura del agua, variando entre el 5° y 15° día de la puesta.

Figura 11 *Dendropsophus nanus* (ranita del zarzal enana)



Larvas: Eclosionan rápidamente durante los dos o tres primeros días, entre los estadios 19-21, con un tamaño aproximado de 3 mm. Luego de su eclosión permanecen adheridas a la vegetación o a las paredes del recipiente que las contiene hasta llegar al estadio 25, antes de los primeros ocho días. A partir de entonces comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Poseen hábitos bentónicos y no son gregarias. Su tasa de desarrollo es moderada: llegan a la metamorfosis en tres meses. La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 35 mm.

Su mantenimiento en laboratorio es muy dificultoso a partir de que comienzan a comer (STD 25), debido a que en la segunda semana de vida no se alimentan, adelgazan y mueren. Además del alimento estándar (lechuga licuada), se les suministró dos tipos de alimento balanceado para peces (“escamado” y “truchina”), soluciones de levadura, monocultivos de algas unicelulares del género *Chlorella* y crías recién eclosionadas de *Artemia salina*. Estos alimentos fueron ofrecidos individualmente y en diferentes combinaciones (mezclas), pero ninguno dio resultado.

Comentarios: Es una especie muy similar a *Dendropsophus sanborni* tanto en los adultos como en las larvas.

Estado de conservación: especie no amenazada.

Dendropsophus sanborni (Schmidt, 1944) (ranita dorada, ranita de sanborn)

Rana arborícola de tamaño pequeño (LT = 15-21 mm) [machos: 15-18 mm; hembras: 18-21 mm].

Descripción: Cuerpo alargado. Cabeza poco distinguible del cuerpo. Hocico romo (no triangular), con narinas superolaterales notorias, separadas por un surco. Región loreal plana. Canto rostral redondeado. Párpados traslúcidos que permiten ver el globo ocular. Tímpano más marcado que en *Dendropsophus nanus*. Piel dorsal lisa, sin glándulas evidentes. Patrón de coloración dorsal homogéneo, color canela pálido a amarronado, más oscuro bajo la línea que comienza el canto rostral y llega a la ingle. Sin líneas glandulares. Con un fino punteado irregular que puede formar estrías. Zonas inguinal, axilar y cara interna del fémur con reticulados amarillo-naranja brillante (coloración *flash*). Antebrazo y tibia acordes al patrón de coloración general. Vientre y región postcloacal con granulaciones menos marcadas que en *Dendropsophus nanus*, de color blanco o blancuzco. Miembros estilizados con discos adhesivos redondos. Pies con membrana interdigital hasta la mitad. Los machos presentan un saco vocal simple, externo y medio de color amarillo- anaranjado.

Canto: El canto nupcial es monótono y suena como la repetición de la vocal “i” o como un agudo chasquido de lengua. Canta en completa oscuridad sobre vegetación palustre (*Salvia*, *Heleocharis*, *Scirpus*), a una distancia de 5 a 15 cm de la superficie del agua. Se conoce el canto nupcial, el canto de lluvia (emitido

cuando hay alta humedad relativa) y el canto ocasional. En época de reproducción se identifican claramente interacciones (combates) entre machos, al igual que en *D. nanus*.

Ambientes en los que habita: En la provincia de Buenos Aires, con una distribución más austral y continental que *D. nanus*. En los alrededores de charcas permanentes y semipermanentes. Se oculta entre la vegetación húmeda, pastizales hidrófilos, formaciones de *Eryngium* spp, troncos caídos y otros objetos que provean un refugio adecuado.

Períodos de actividad: Principalmente en verano, por su período reproductivo (noviembre, diciembre y enero). Durante la mayor parte del año permanece oculta.

Reproducción: Hacia fines de la primavera y durante todo el verano. A diferencia de otras especies, continúa cuando los cuerpos de agua comienzan a secarse. Los machos cantan preferentemente de noche sobre la vegetación flotante o emergente, camalotes (*Pontederia*, *Nymphoides*, *Eichhornia*), saetas (*Sagittaria*), cola de zorro (*Ceratophyllum*), lentejas de agua (*Lemna*, *Spirodela*), repollitos de agua (*Pistia*) y helechitos de agua (*Azolla*, *Salvinia*), en coros numerosos. Luego de un pico reproductivo, la actividad disminuye, pero continúa durante un tiempo prolongado con pocos machos cantando. Los amplexos se forman por sobre la superficie del agua y luego se sumergen para colocar los huevos.

Puesta: Pocos huevos (entre 50 y 160), pigmentados, agrupados en cordones muy entremezclados formando pequeñas masas adheridas a la vegetación sumergida dentro de los 10 cm superficiales de la columna de agua. Embriones de color marrón a negro. Tiempo de eclosión sujeto a la temperatura del agua, variando entre el 5° y 15° día de la puesta.

Larvas: Eclosionan rápidamente durante los dos o tres primeros días, entre los estadios 19-21, con un tamaño aproximado de 3 mm. Luego de su eclosión permanecen adheridas a la vegetación o a las paredes del recipiente que las contiene, hasta llegar al estadio 25, antes de los primeros ocho días. A partir de entonces comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Poseen hábitos bentónicos y no son gregarias. Su tasa de desarrollo es moderada: llegan a la metamorfosis en tres meses. La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 30-35 mm.

Su mantenimiento en laboratorio es muy dificultoso a partir de que comienzan a comer (STD 25), debido a que en la segunda semana de vida no se alimentan, adelgazan y mueren. Además del alimento estándar (lechuga licuada), se les suministró dos tipos de alimento balanceado para peces (“escamado” y “truchina”), soluciones de levadura, monocultivos de algas unicelulares del género *Chlorella* y crías recién eclosionadas de *Artemia salina*. Estos alimentos fueron ofrecidos individualmente y en diferentes combinaciones (mezclas), pero ninguno dio resultado.

Figura 12 *Dendropsophus sanborni* (ranita dorada, ranita de sanborn)



Comentarios: Es una especie muy similar a *D. nanus*, tanto en los adultos como en las larvas.

Estado de conservación: Establecida como taxón indeterminado, por lo que fue categorizada como especie no amenazada.

Género *Hypsiboas* (Wagler, 1830)

Una sola especie habita la provincia de Buenos Aires:

Hypsiboas pulchellus (Duméril y Bibron, 1841)(rana del zarzal o ranita verde)

Rana arborícola de tamaño mediano (LT = 37-50 mm) [machos: 37-47 mm; hembras: 39-55 mm].

Descripción: Piel dorsal lisa, sin glándulas evidentes. Patrón de coloración homogéneo o reticulado, con diferentes tonos de marrón, verde, gris o marfil. Límite entre dorso y flancos diferenciado por una cadena de glándulas que se ubica por detrás del tímpano. Flanco con una línea blanca que corre entre el ojo y la ingle, generalmente limitada por una línea oscura de posición ventral. Cabeza

con una línea marrón, a veces acompañada por otra blanca, que pasa por el canto rostral, atraviesa el ojo y finaliza en la axila. Zonas inguinal, axilar y cara interna del fémur con un reticulado negro (coloración *flash*). Antebrazo y tibia con líneas glandulares. Vientre amarillento o blancuzco. Miembros estilizados. Dedos I, II y III reunidos por una membrana con discos adhesivos chatos y redondos. Los machos presentan el pollex más desarrollado y un saco vocal simple, externo y medio de color amarillo o anaranjado.

Canto: Se conoce el canto nupcial (“ticlick, ticlick-ticlick, ticlick, ticlick”), un canto de inicio a modo de silbido (“buuuiiiii”), canto de lluvia (emitido cuando hay alta humedad relativa y también como canto de comunicación), canto ocasional y canto de angustia (similar a un maullido). Los coros reproductivos son numerosos y pueden oírse desde grandes distancias (300-1.000 m).

Ambientes en los que habita: En una gran variedad de ambientes en toda la provincia de Buenos Aires: pastizales inundables, alrededores de charcas temporarias o permanentes, pequeños arroyos y lagunas en zonas abiertas, ceibales, juncales, pastizales de *Stipa* o matorrales de *Baccharis*. Frecuentemente en viviendas periurbanas, donde se refugia en galpones, casas o cualquier sitio que le brinde protección (chapas, maderas, etc.).

Períodos de actividad: Es la especie que presenta mayor amplitud en cuanto a su actividad. Sólo está inactiva durante la época más cruda del invierno, momento en el que hiberna bajo tierra, en la base o raíces de distintas matas de pastos, arbustos o cualquier otro sitio que le dé refugio. La mayor parte del año se encuentra en algún tipo de actividad (desplazamientos, reproducción, alimentación).

Reproducción: Posee un patrón de reproducción discontinuo, potencialmente continuo, asociado con la disponibilidad de agua y las grandes lluvias. Puede reproducirse al menos dos veces por año: fines de invierno-principios de primavera y fines de verano-principios de otoño, incluso con bajas temperaturas (5-10°C). Los machos forman coros numerosos, fácilmente reconocibles. Cantan durante toda la noche, preferentemente flotando con las patas totalmente extendidas o trepados sobre la vegetación. El amplexo se forma fuera del agua, se sumergen momentos antes de la puesta, para colocar sus huevos velozmente adheridos a la vegetación acuática.

Puesta: Entre 300 y 3.000 huevos agrupados en cordones muy entremezclados formando masas irregulares o en forma de huso helicoidal, adheridas a la vegetación sumergida dentro de los 10 cm superficiales de la columna de agua. Embriones de color marrón a negro. Tiempo de eclosión sujeto a la temperatura del agua, variando entre el 5º y 15º día de la puesta.

Figura 13 *Hypsiboas pulchellus* (rana del zarzal o ranita verde)



Larvas: Eclosionan entre los dos y cuatro primeros días, entre los estadios 19-21, con un tamaño aproximado de 3 mm. Luego de su eclosión permanecen adheridas a la vegetación o a las paredes del recipiente que las contiene hasta llegar al estadio 25, entre los primeros cinco a siete días. A partir de entonces comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Son larvas muy nadadoras, poseen hábitos nectónicos-bentónicos y no son gregarias. Su tasa de desarrollo es de moderada a lenta: alcanzan la metamorfosis entre uno y tres meses en larvas de primavera-verano y en seis meses o más en larvas de otoño-invierno (invernales). La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 70 mm.

Su mantenimiento en laboratorio es sencillo y no presenta dificultades. Se las puede mantener en diferentes condiciones y regular su desarrollo, variando los niveles de agua y comida. Aceptan lechuga licuada y otros alimentos, aumentando sus tasas de desarrollo con los más nutritivos (proteínas de origen animal). Son resistentes al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 50 y 75%.

Comentarios: Especie muy abundante.

Estado de conservación: Categorizada como especie no amenazada.

Género *Scinax* (Wagler 1830)

Formas de tamaño pequeño (*S. berthae*, *S. squalirostris*) a mediano (*S. nasicus*, *S. granulatus*). La mayoría presenta la cabeza acuminada. Hocico alargado, ancho y aplanado. Región loreal deprimida. Piel dorsal lisa con granulaciones. Coloración irregular que recuerda un liquen. Mancha interocular oscura e interescapular con forma de paréntesis con la concavidad hacia fuera (o forma de X). Miembros posteriores cortos y tibias muy engrosadas. Membrana entre dedos del pie I-II ausente o reducida a un reborde sobre el margen interno del dedo II. Membrana entre los II-III, III-IV y IV-V desarrollada. Dedos adhesivos de las manos dilatados, truncados, más anchos que largos. Son ágiles y rápidas. Poseen la capacidad de moverse sobre sustratos verticales tanto hacia atrás como hacia los costados, además de la capacidad de permanecer adheridas a un sustrato vertical, en reposo o en locomoción, con la cabeza hacia abajo. Poseen cantos nupciales graves, poco musicales, que recuerdan el ruido de motores eléctricos o ronquidos. Cuatro especies habitan la provincia de Buenos Aires:

Scinax berthae (Barrio, 1962) (ranita intrépida)

Rana arborícola de pequeño tamaño (LT = 19-28 mm) [machos: 19-22 mm; hembras: 20-28 mm].

Descripción: Cuerpo alargado. Cabeza más larga que ancha. Hocico alargado en punta, con narinas notorias de posición laterodorsal. Ojos grandes. Región loreal cóncava, canto rostral marcado. Tímpano visible, redondo y pliegue supratímpanico notorio. Piel dorsal granulosa, con cadena glandular timpánica. Dorso marrón con manchas oscuras. Mancha interocular en forma de murciélago. Dos líneas oscuras dorsolaterales a cada lado: una desde las narinas, pasando por los ojos y continuando detrás de los ojos hasta los flancos; otra va por el dorso y se extiende hasta la ingle. Zonas inguinal, axilar y cara interna del fémur con manchas irregulares amarillo-anaranjadas. Extremidades acordes al patrón de coloración general y con bandas transversales oscuras. Vientre liso con algunos gránulos en el tórax, abdomen y parte inferior de los muslos. Miembros estilizados con discos adhesivos redondos. Pies con membrana interdigital hasta la mitad. Los machos presentan el saco vocal simple, externo y medio de color amarillo-anaranjado.

Canto: Poseen un canto nupcial enérgico y monótono que recuerda al de las langostas y suele confundirse con el junquero (*Phleocryptes melanops*). Cantan por la noche y hasta la madrugada sobre vegetación palustre, juncos, totoras, cortaderas (*Cortadeira selloana*) y paja brava (*Scirpus giganteum*) a más de 30 cm, trepados sobre la vegetación emergente (pudiendo variar esta altura entre 30

y 150 cm de la superficie del agua). Es común escuchar cantos de comunicación o lluvia por las tardes o cuando la humedad relativa es alta.

Ambientes en los que habita: En la franja costera de la provincia de Buenos Aires, desde el delta hasta Punta Indio, en los alrededores de charcas permanentes y semipermanentes. Muy asociada a ambientes costeros y frecuente en pajonales ribereños y típicos pastizales modificados, con matas de *Juncus acutus* y *Eryngium* spp. También se la puede encontrar refugiada en vegetación hidrófila (*Scirpus* spp), cerca de lagunas y bajo troncos o cortezas de troncos caídos.

Períodos de actividad: Principalmente en primavera-verano, por su período reproductivo (septiembre-diciembre). Durante la mayor parte del año permanece oculta.

Reproducción: Desde fines de septiembre a fines de diciembre. Los machos cantan por la noche y hasta la madrugada, posados sobre hojas y tallos de gramíneas y ciperáceas. Tienen especial predilección por la falsa cortadera (*Scirpus giganteus*) que, según parece, actuaría como resonador, ampliando la potencia de su canto. Forman coros numerosos y cantan preferentemente de noche.

Puesta: Entre 200 y 400 huevos pigmentados agrupados en cordones muy entremezclados formando pequeñas masas adheridas a la vegetación sumergida dentro de los 10 cm superficiales de la columna de agua. Embriones de color marrón a negro.

Larvas: Eclosionan rápidamente a partir del 2º día, entre los estadios 19-21, con un tamaño aproximado de 3 mm. Luego de su eclosión permanecen adheridas a la vegetación o a las paredes del recipiente que las contiene hasta llegar al estadio 25, a partir del 3º día. Desde entonces comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Son larvas nadadoras, poseen hábitos nectónicos-bentónicos y no son gregarias. Su tasa de desarrollo es de intermedia a alta: llegan a la metamorfosis entre uno y cuatro meses. La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 25 mm.

Su mantenimiento en laboratorio no presenta complicaciones si se las mantiene en bajas densidades, recipientes profundos y con buena aireación. Aceptan lechuga licuada y otros alimentos, aumentando sus tasas de desarrollo con los más nutritivos (proteínas de origen animal). Son resistentes al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 50 y 75%.

Comentarios: Especie muy ágil y escurridiza.

Estado de conservación: Categorizada como especie no amenazada.

Figura 14 *Scinax berthae* (ranita intrépida)



***Scinax squalirostris* (Lutz, 1925) (ranita hocicuda)**

Rana arborícola de pequeño tamaño (16-28 mm) [machos: 16-27 mm; hembras: 21-28 mm].

Descripción: Cuerpo alargado. Cabeza mucho más larga que ancha. Hocico muy largo y acuminado. Mandíbula superior proyectada más que la inferior, con narinas notorias de posición dorsales. Ojos grandes y laterales. Región loreal cóncava, canto rostral marcado. Tímpano redondo, disimulado en las bandas negras que caracterizan su coloración rayada longitudinal negra y amarillo-dorada. Piel dorsal lisa con pequeños gránulos dispersos. Vientre granular. Coloración dorsal con un fondo marrón pálido a amarillento, con dos líneas laterales marrón oscuro a negro, que parten de las narinas, pasan por el ojo, se continúan en la pupila horizontal, disimulan el tímpano y se ensanchan gradualmente hasta la ingle. Esta última línea encierra, con otra línea paralela más dorsal y menos ancha, una línea longitudinal de color dorado a blanco amarillento que comienza en las narinas, disimula el párpado y se continúa, manteniendo el mismo ancho que la línea inferior negra, hasta la ingle. Dorsalmente puede presentar una fina línea vertebral negra que, cuando existe, parte de la punta del hocico. Las extremidades presentan bandas longitudinales oscuras y puntos difusos en las patas, los muslos, antebrazos y dedos. Piel ventral color blanquecino a amarillo verdoso en garganta y abdomen. Puede presentar rosado en el pecho y las extremidades. Los machos poseen saco vocal simple, externo y medio de color amarillo intenso.

Canto: Semeja el sonido producido al dar cuerda a un reloj despertador antiguo, suele escucharse desde el atardecer y durante toda la noche. Los coros reproductivos se oyen desde distancias intermedias (entre 100 y 300 m). Comienzan a cantar al atardecer y continúan hasta la madrugada. Es frecuente que canten durante el día.

Ambientes en los que habita: En la franja costera de la provincia de Buenos Aires desde el delta hasta el Partido de la Costa, en los alrededores de charcas permanentes y semipermanentes. Se la suele encontrar refugiada en comunidades dominadas por *Eryngium* spp. o en las márgenes de los cuerpos de agua en los que se reproduce, en plantas que forman matas densas (juncáceas o ciperáceas). Además se la puede encontrar refugiada bajo troncos caídos y otros objetos que le brinden protección.

Figura 15 *Scinax squalirostris* (ranita hocicuda)



Períodos de actividad: Durante gran parte del año, por sus tres períodos reproductivos. Mayor abundancia y frecuencia en primavera-verano (desde septiembre hasta fines de febrero) y menor en otoño (fines de mayo) coincidiendo con el descenso brusco de la temperatura. Hiberna durante los meses más fríos y,

junto con *Pseudis minutus*, es una de las primeras especies en abandonar ese estado.

Reproducción: Sujeta a la presencia de agua en las charcas y en relación con las grandes lluvias. Comúnmente presenta tres períodos marcados y una actividad reproductiva de base, con pocos individuos activos durante el resto del año, a excepción de los meses más fríos (junio y julio). Los primeros signos de actividad reproductiva comienzan sutilmente con el aumento de temperatura luego del invierno, utilizando el nivel de agua remanente. El primer período marcado coincide con las grandes lluvias de primavera (octubre); el segundo, con las primeras grandes lluvias que forman las charcas en enero-febrero, y finalmente, el tercer pico reproductivo, con un menor número de individuos, antes de la llegada del invierno. Este último implica larvas invernales que metamorfosean con la llegada de la primavera. Los machos cantan de noche, generalmente trepados a la vegetación (ciperáceas, juncáceas, y demás vegetación riparia), ocultos en la base o hasta unos 20 cm de la superficie del agua. El amplexo se produce fuera del agua y se sumergen para oviponer.

Puesta: Huevos pigmentados agrupados en cordones muy entremezclados que forman pequeñas masas adheridas a la vegetación sumergida dentro de los 10 cm superficiales de la columna de agua. Los embriones son de color marrón a negro. Pueden colocar entre 150 y 500 huevos.

Larvas: Eclosionan rápidamente entre el 3º y 4º día, entre los estadios 19-21, con un tamaño aproximado de 3 mm. Luego de su eclosión permanecen adheridas a la vegetación o a las paredes del recipiente que las contiene durante los primeros cinco a siete días, momento en el que alcanzan el estadio 25 de su desarrollo. A partir de entonces comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Son larvas nadadoras, poseen hábitos neotónicos y no son gregarias. Su tasa de desarrollo es de intermedia a alta: alcanzan la metamorfosis entre uno y cuatro meses. La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 30 mm.

Su mantenimiento en laboratorio no presenta complicaciones si se las mantiene en bajas densidades, recipientes profundos y con buena aireación. Aceptan lechuga licuada y otros alimentos, aumentando sus tasas de desarrollo con los más nutritivos (proteínas de origen animal). Son larvas resistentes al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 50 y 75%.

Comentarios: Especie de muy fácil reconocimiento por su largo hocico y coloración en bandas longitudinales característica.

Estado de conservación: especie aparentemente no amenazada, categorizada como especie no amenazada.

Scinax granulatus (Peters, 1871) (ranita roncadora o ranita granulada)

Rana arborícola de tamaño mediano (LT = 32-38 mm) [machos: 16-27 mm; hembras: 21-28 mm].

Figura 16 *Scinax granulatus* (ranita roncadora o ranita granulada)



Descripción: Frecuentemente confundida con *Scinax nasicus*, se distingue de ésta por su cuerpo más robusto, piel más áspera y granulada, cabeza más ancha y ojos más grandes y salientes. Tímpano visible. El canto rostral es alto y su hocico sin rasgos definidos como *S. nasicus*. Los dedos y discos adhesivos de manos y pies son más anchos que en *S. nasicus*. Piel dorsal granulosa, grisácea, tanto clara como oscura, con un patrón similar a un liquen. Manchas en forma de X en la región escapular. Coloración ventral clara, con gránulos glandulares de diferentes tamaños. Dorso de los miembros con barrado oscuro perpendicular. Superficie posterior y oculta de los muslos con reticulado anaranjado y rosado oscuro (coloración *flash*). Los machos poseen un saco vocal medio externo pigmentado de rosado oscuro y amarillo-anaranjado.

Canto: Poseen canto nupcial, canto de comunicación y defensivo. El canto nupcial es grave, de estructura multipulsada, suena como un “trrrac, trrrac, trrrac, trrrac, trrrac”, similar a un ronquido o al sonido de un motor eléctrico, como el de una

máquina de coser. Los coros reproductivos suelen escucharse de lejos (100-300 m). El canto de comunicación es esporádico y lo emiten al salir de la hibernación, desde dentro de sus refugios, o antes de migrar hacia los sitios reproductivos, tanto al amanecer como al atardecer.

Ambientes en los que habita: Muy común en la provincia de Buenos Aires, con una distribución más austral y más continental que *S. nasicus*. En típicos campos de la pampa con pastizales inundables y alrededores de charcas temporarias o permanentes, pequeños arroyos y lagunas en zonas abiertas, también en comunidades dominadas por *Eryngium*. Se suelen refugiar en montes de árboles exóticos (paraísos, acacias, eucaliptus) presentes en los campos de la provincia, dado que éstos brindan gran variedad de refugios: hojarasca, ramas y troncos caídos y cortezas desprendidas.

Períodos de actividad: Durante el otoño y hasta fines de agosto se encuentra en pausa, oculta en cualquier refugio que posea las condiciones adecuadas de temperatura y humedad para su supervivencia. Es de hábito domiciliario (ver el apartado Familia Hylidae, Rafinesque 1815). Es común hallarla activa durante los picos de precipitaciones de comienzos de la primavera (fines de agosto y septiembre) y fines del verano (febrero), cantando en los alrededores de los cuerpos de agua donde se reproduce.

Reproducción: Por lo general se reproduce dos veces al año, a principios de la primavera y fines del verano, aunque el segundo período reproductivo puede no ocurrir. El principal, el de primavera, se desencadena a partir del aumento definitivo de temperatura y fotoperíodo, sumado a las grandes lluvias características de esa época del año. La segunda reproducción ocurre sólo si se producen grandes lluvias durante febrero. Los machos cantan continuamente durante toda la noche, desde la puesta hasta la salida del sol, con mayor intensidad entre las 0:00 y 3:00 h, frecuentemente trepados a la vegetación emergente (juncos y totoras) o a la flora que rodea la charca, desde alturas entre 20 y 50 cm. Se han registrado cantos diurnos sólo los días posteriores a noches en las que se confirmó la reproducción.

Puesta: Entre 300 y 1.500 huevos dispersos por el fondo y adheridos al sedimento o a objetos sumergidos, de manera individual o en pequeños grupos de 2 o 3. Tiempo de eclosión sujeto a la temperatura, variando dentro de los 3 días de la puesta. Embriones mitad negros y mitad blancos.

Larvas: Eclosionan rápidamente entre el 2º y 3º día, entre los estadios 19-21, con un tamaño aproximado de 2,5 mm. Luego de su eclosión permanecen adheridas a la vegetación o a las paredes del recipiente que las contiene durante los primeros cinco a siete días, momento en el que alcanzan el estadio 25 de su desarrollo. A partir de entonces comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Son larvas nadadoras, poseen hábitos nectónicos y no son gregarias. Su tasa de desarrollo

es alta: alcanzan la metamorfosis entre uno y dos meses. La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 30 mm.

Su mantenimiento en laboratorio no presenta complicaciones si se las mantiene en bajas densidades, recipientes profundos y con buena aireación. Aceptan lechuga licuada y otros alimentos, aumentando sus tasas de desarrollo con los más nutritivos (proteínas de origen animal). Son larvas resistentes al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 50 y 75%.

Estado de Conservación: especie aparentemente no amenazada, categorizada como especie no amenazada.

Subfamilia *Pseudinae* (Fitzinger, 1843)

La subfamilia *Pseudinae* reúne formas acuáticas de aspecto triangular. Cabeza robusta. Ojos dorsales próximos y prominentes. Dientes maxilares y vomerianos muy desarrollados. Dedos de las manos libres con pulgares oponibles. Dedos de los miembros posteriores totalmente palmados. Se caracterizan por poseer cartílagos intercalares largos entre la última y penúltima falange. Coloración dorsal verdosa uniforme. Piel dorsal fina y lisa, pudiendo presentar granulaciones en mayor o menor grado. Coloración ventral generalmente clara, con gránulos glandulares de diferentes tamaños. Se alimentan principalmente de invertebrados acuáticos, microcrustáceos y peces. Existen en Argentina cuatro especies de esta subfamilia. De estas cuatro, sólo dos especies habitan la provincia de Buenos Aires.

***Pseudis* (Wagler, 1830)**

Ranas acuáticas, robustas y nadadoras. Cabeza ancha y ojos dorsales próximos y prominentes, con pupila horizontal. Tímpano grande y distinguible. Dedos de la mano libres y dedos del pie totalmente palmados. Piel dorsal lisa poco granular. Posee una capa calcificada en la dermis. Una sola especie habita en la provincia de Buenos Aires:

***Pseudis minutus* (Günther, 1858) (ranita boyadora o ranita acuática)**

Rana de tamaño mediano (LT = 25-48 mm) machos: 25-40 mm; hembras: 32-48 mm.

Descripción: Cabeza ancha, redondeada u ojival. Hocico acuminado y redondeado. Ojos dorsales muy prominentes y juntos, con pupila horizontal. Tímpano muy notorio, con pliegue supratimpánico evidente. Narinas ubicadas dorsalmente. Piel dorsal de aspecto liso, pero con verrugas cónicas numerosas y pequeñas dispersas sobre el dorso y los miembros. Miembros anteriores cortos. Mano con pulgar oponible y dedos libres. Falanges terminales poco expandidas, sin discos adhesivos. Miembros posteriores largos. Pie con membrana digital escotada que

se extiende hasta la base de los discos terminales. Un solo tubérculo metatarsal que corresponde al interno. La articulación tibio-tarsal supera el hocico cuando la pata es estirada hacia delante. Piel granular, excepto en la cabeza, de color homogéneo, verde o amarronado variando de claro a oscuro y pudiendo presentar hileras de grandes manchas oscuras difusas e irregulares. Vientre liso y blancuzco amarillento con manchas acaneladas. Puede presentar puntos marrón-rojizos sobre la coloración ventral. Parte posterior de los muslos con líneas longitudinales parduscas a negras (líneas femorales), en número no mayor a 5. Extremidades con bandas oscuras marrón-verdoso, longitudinales y anchas que continúan la coloración posterior de los muslos dejando una franja blancuzca en la región más ventral de las mismas. Esqueleto de color verde (cloricia fisiológica). Los machos poseen doble saco vocal, laterales verde oscuro a negros que se pliegan quedando como arrugas en la región gular, disimulados como dos líneas negras. Poseen además callosidades nupciales en los dedos de la mano.

Canto: El canto nupcial es fuerte, irregular y poco armonioso, semejante a un breve crujido. Se escucha desde muy lejos (entre 300 y 1.000 m) y es de muy fácil reconocimiento. Suelen emitir un canto corto de advertencia o territorial cuando se mueve el agua cercana a la vegetación entre la cual se encuentran ocultas.

Ambientes en los que habita: Común en la provincia de Buenos Aires. Distribución asociada de manera directa a las cuencas de los grandes arroyos que desembocan en el Río de la Plata y sus áreas de inundación. Es muy acuática. Vive de manera permanente en lagunas y charcas. En períodos de sequía puede sobrevivir en pequeños volúmenes de agua u oculta en cuevas, debajo de troncos y en cualquier refugio que posea las condiciones adecuadas de temperatura y humedad para su supervivencia. Convive con las actividades humanas en agroecosistemas, monocultivos de prácticas intensivas y extensivas.

Períodos de actividad: Durante gran parte del año, ya que sus períodos reproductivos abarcan las cuatro estaciones. Está asociada al agua la mayor parte del tiempo, pero puede estivar o hibernar enterrada o refugiada fuera del agua. Es de fácil observación y su presencia es conspicua cuando se encuentra en actividad reproductiva. Cuando se mueve la superficie del agua cercana a la vegetación entre la cual se encuentra oculta suele emitir un canto corto, territorial. Bajo lluvias copiosas suele moverse entre los charcos para colonizar nuevos ambientes. De hecho, corroboramos la ausencia de esta especie durante el período 1998-2002 y su presencia, a partir de la lluviosa primavera de 2002, simultáneamente en todas las charcas del área de estudio.

Reproducción: Posee tres períodos reproductivos marcados: de mediados de julio a principios de noviembre, de mediados de diciembre a fines de enero y entre febrero y abril (incluso después de la baja de temperatura invernal). Realiza su reproducción en los sitios donde habita: cuerpos de agua estancados y ambientes permanentes profundos y vegetados. Los machos cantan flotando en el agua, con sus cuatro patas extendidas, escondidos entre la vegetación, generalmente entre la carpeta vegetal compuesta por lentejas de agua (*Lemna*, *Spirodela*, *Wolffiella*),

repollitos de agua (*Pistia*) y camalotes (*Pontederia*, *Nymphoides*, *Eichhornia*). Cantan generalmente durante la noche y en ocasiones de día. Las parejas en amplexo colocan sus huevos por intervalos de tiempo y se separan rápidamente luego de efectuada la puesta.

Puesta: Disgregadas en masas gelatinosas conformadas por grupos de 40-50 huevos, adheridos a la vegetación sumergida. Estas posturas parciales se realizan en cortas inmersiones, que descansan o toman aire para luego sumergirse nuevamente y colocar otro grupo de huevos. Como resultado final, las puestas en su totalidad suelen tener entre 300 y 1.200 huevos en los que se distinguen las membranas transparentes características y embriones claros que poseen un tinte verdoso en el polo vegetativo.

Figura 17 *Pseudis minutus* (ranita boyadora o ranita acuática)



Larvas: Eclosionan rápidamente entre el 2º y 3º día, entre los estadios 19-21, con un tamaño aproximado de 2,5 mm. Luego de su eclosión permanecen adheridas a la vegetación o a las paredes del recipiente que las contiene durante los primeros ocho días, momento en el que alcanzan el estadio 25 de su desarrollo. A partir de entonces comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Son larvas nadadoras y poseen hábitos nectónicos. Las puestas de otoño suelen pasar el invierno como

larvas y metamorfosear en la primavera (larvas invernales), al igual que las de *H. pulchellus* y *O. americanus*. Poseen una velocidad de desarrollo de intermedia a alta: llegan a la metamorfosis entre dos meses y medio y cuatro meses y medio en el período invernal. La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 50 mm.

Su mantenimiento en laboratorio no presenta complicaciones si se las mantiene en bajas densidades, recipientes profundos y con buena aireación. Aceptan lechuga licuada y otros alimentos, aumentando sus tasas de desarrollo con los más nutritivos (proteínas de origen animal). Son larvas resistentes al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 50 y 75%. Metamorfosean y no salen del agua, continuando su vida acuática, lo que facilita mucho el cuidado y mantenimiento de los juveniles.

Estado de conservación: Categorizada como especie no amenazada.

Familia *Leptodactylidae*, (Werner, 1896, 1838)

La familia *Leptodactylidae* reúne un gran número de formas que habitan un amplio rango de ambientes, desde especies semiacuáticas hasta las menos dependientes del agua. Poseen una gran variedad de estrategias reproductivas y muestran morfotipos heterogéneos. Posiblemente sea un grupo parafilético y en un futuro sea separado en sus respectivos grupos naturales. De manera muy general, a los integrantes de este grupo se los denomina ranas y se describen como especies con piel lisa, formas globosas a estilizadas, mayormente saltadoras. Pueden presentar formaciones glandulares que las caracterizan, pero están ausentes las glándulas parotoides, lo que las diferencia de los Bufónidos o sapos. Existen en Argentina 94 especies de esta familia, repartidas en 4 subfamilias y 19 géneros. De éstas, sólo 13 especies habitan la provincia de Buenos Aires.

Subfamilia *Ceratophryinae* (Tschudi, 1838)

Género *Ceratophrys* (Wied-Neuwied, 1824)

Formas grandes y robustas. Pupila horizontal. Exostosis en cráneo y tronco. Proyección tegumentosa en párpado superior. Dientes no pedicelados. Tubérculos metatarsales de tipo cavador. Dedos libres, pies con membrana interdigital. Especies agresivas y de aspecto llamativo conocidas por el nombre vulgar de escuerzos. Una especie habita la provincia de Buenos Aires.

Ceratophrys ornata (Bell, 1843) (escuerzo o escuerzo grande)

Rana de tamaño grande (80-132 mm) machos: 80-105 mm; hembras: 90-133 mm.

Descripción: Grande y de aspecto bufonoide, robusta y colorida. Boca muy grande con dientes cónicos y afilados. Ojos prominentes con proyección carnosa en párpado superior y pupila horizontal (se ve como una pupila circular con manchas rectangulares a ambos lados). Exostosis en cráneo y tronco. Piel de la cabeza unida a los huesos (dermostosis). Cabeza alta y ancha. Hocico exageradamente alto y borde de boca redondeado, en forma de semicírculo perfecto. Tímpano visible, disimulado con manchas, más notorio en los machos. Tubérculo metatarsal interno muy cornificado y desarrollado, en forma de cuchara de albañil. Piel dorsal osificada en la región cefálica y con ornamentaciones, crestas y notables pliegues glandulares dorsales de bordes afilados, que sobresalen hasta 5 mm de la superficie del cuerpo, ubicados en el centro de manchas oscuras salpicadas de verrugas. Callosidades dérmicas en el centro del párpado superior. Dorso amarillento o verdoso con manchas marrones ovales dispuestas de a pares, salvo en el centro del escudo dorsal y del hocico. Mancha oscura que nace del extremo superior de cada párpado disimulando los ojos y se une medialmente formando una V. Al cambiar la piel o al mojarse presentan tonalidades brillantes de amarillo, verde claro y rojo. Coloración ventral clara, blanquecino-amarillenta, con bordes amarillos. Miembros delanteros cortos, que al igual que los traseros, mantienen la coloración del cuerpo tanto dorsal como ventralmente. Machos con saco vocal interno y dedos internos de la mano con callosidades nupciales lisas de color gris. Garganta moteada y teñida de gris verdoso muy oscuro en época reproductiva.

Canto: El canto nupcial es un agudo lamento metálico que recuerda a una armónica o a algún acorde agudo de acordeón. Se repite a intervalos regulares relativamente largos. Es oído a grandes distancias (a más de 1.000 m).

Ambientes en los que habita: Común en toda la extensión de la provincia de Buenos Aires. Desde selvas ribereñas, barrancas del delta, pastizales pampeanos cerca de arroyos, hasta ambientes psamófilos como playas y dunas de la costa atlántica. Convive con las actividades humanas en los campos ganaderos, utilizando las huellas de vacas como escondite para acechar a sus presas (crías de aves de corral, ratones, culebras y otros anuros). Utiliza los bebederos como sitios de reproducción y refugio. No poseemos datos que confirmen su presencia en monocultivos.

Períodos de actividad: Durante primavera y verano por su período reproductivo (septiembre-febrero). La mayor parte del tiempo se oculta enterrada o semienterrada (sólo se ven sus ojos). Es un predador al acecho, por lo que es muy difícil de encontrar. Sólo es visible cuando migra hacia el sitio reproductivo (cruzando rutas o en el campo) generalmente bajo fuertes lluvias (diluvios), o bien en plena actividad reproductiva en la charca.

Figura 18 *Ceratophrys ornata* (escuerzo o escuerzo grande)



Reproducción: Muy esporádica. Presentan intervalos de 2 a 6 años en los que no se reproducen ni presentan actividad de ningún tipo, permaneciendo enterrados y envueltos en capas de queratina (cocones) en estado de latencia (hibernación o estivación). Estas épocas coinciden con años o períodos secos. Sólo vuelven a la actividad en períodos muy lluviosos, en los que se producen inundaciones. En esas condiciones se desentierran y comienzan a comer y a migrar bajo la lluvia hacia los sitios de reproducción. Estos sitios suelen estar conformados por charcos temporarios, arroyos de primer orden o planicies de inundación de arroyos más grandes totalmente desbordados. De esto se deduce que esta especie se reproduce en lagunas efímeras de grandes extensiones, que en pocos días se reducen a los cuerpos de agua originarios. Las observaciones que hemos realizado indican una coincidencia temporo-espacial plena del período reproductivo de *C. ornata* con la reproducción de *B. arenarum* y *B. fernandezae*, de los cuales se alimentan tanto los adultos (de adultos) como las larvas (de larvas). Los machos cantan muy espaciados entre sí (a más de 100 m de distancia entre uno y otro), trepados a vegetación que forme matas o a *Eryngium*, durante día y noche. La actividad reproductiva posee una duración muy corta, de 24 a 48 h. Las parejas en amplexo dispersan sus huevos en el agua de manera individual (ver puesta) y pueden estar hasta 15 días sin soltarse.

Puesta: Entre 300 y 1.000 huevos que son dispersos individualmente en el fondo del cuerpo de agua. Son de gran tamaño (2-2,4 mm). Presentan las membranas características transparentes y los embriones pigmentados. No poseen una

envoltura común, pero cada uno de ellos está cubierto por una pequeña capa gelatinosa muy blanda, fluida y pegajosa, que si bien no logra adherir el huevo a los objetos y plantas sumergidas, permite que se cubra rápidamente con el material particulado que se encuentra en suspensión en el agua o sedimento.

Larvas: Eclosionan rápidamente entre el 2º y 3º día, entre los estadios 19-21, con un tamaño aproximado de 6 mm. Luego de su eclosión permanecen adheridas a la vegetación o a las paredes del recipiente que las contiene durante los primeros ocho días, momento en el que alcanzan el estadio 25 de su desarrollo. A partir de entonces comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Son larvas nadadoras de hábitos bentónicos y no son gregarias. Por el contrario, se dispersan homogéneamente (patrón uniforme), y cuando por azar se ponen en contacto unas con otras se repelen emitiendo un sonido subacuático. Son muy predatoras, carnívoras y se desarrollan rápidamente: llegan a la metamorfosis a partir de un mes, aunque pueden retrasarse hasta cinco meses en cautiverio, principalmente por falta de comida. Se alimentan de otras larvas con las que cohabitan y se desarrollan simultáneamente (ej.: *B. arenarum* y *B. fernandezae*). La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 60 mm.

Su mantenimiento en laboratorio no presenta complicaciones si se las mantiene en muy bajas densidades y se contempla la posibilidad de canibalismo en condiciones de mala alimentación. Se desarrollan bien en recipientes playos con poca aireación. En los primeros estadios aceptan lechuga licuada y todo alimento vivo que su tamaño les permita ingerir (crías de *Artemia salina*, *Daphnia*, *Tubifex*, larvas de otros anuros y alevinos de peces, en orden creciente), además de carne vacuna y cualquier otro recurso animal inerte, debido a que también son carroñeros. Son larvas resistentes al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 50 y 75%.

Comentarios: Especie muy sigilosa y críptica, muy difícil de observar. Interrumpe su canto cuando percibe la presencia del hombre a partir de 50 m y no vuelve a cantar hasta que la persona se aleja a una distancia prudencial. Preda sobre otros vertebrados pequeños (peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos). Anuro agresivo. En actitud de defensa emite fuertes chirridos al expulsar el aire de los pulmones. Al abrir la boca permite ver su interior rosado. Por su actitud, algunas leyendas urbanas y otras creencias, sumado a que eventualmente puede comer crías de aves de corral y de otros animales domésticos, fue ampliamente combatido por la población rural y por los habitantes periurbanos. Es ofrecido como mascota albina (criado en EEUU) y posee un gran valor para los coleccionistas de animales vivos, lo que ha generado un gran número de reportes relacionados con su mantenimiento en cautiverio.

Estado de conservación: Especie vulnerable, categorizada como especie no amenazada.

Subfamilia *Telmatobiinae* (Fitzinger, 1843)

Género *Odontophrynus* (Reinhardt y Lütken, 1862)

Dos especies habitan la provincia de Buenos Aires. Ambas son formas de tamaño mediano y cuerpo globoso, de aspecto robusto. Poseen la piel gruesa y densamente granulada. Son de hábitos terrestres, con menor dependencia del agua dentro de la familia. Son fosoriales, cavan sus propias cuevas con las patas traseras, enterrándose rápidamente. Se alimentan de lombrices, larvas de coleópteros, etc. Son resistentes a la desecación y poseen la propiedad de rehidratarse rápidamente. Sus larvas poseen desarrollo lento y son de gran tamaño.

Odontophrynus americanus (Duméril y Bibron, 1841) (escuerzo chico o escuercito)

Escuerzo de tamaño mediano (LT = 36,5-63,5) machos: 36,5-63,5 mm; hembras: 37-58,5 mm.

Descripción: Aspecto de escuerzo. Rana de tamaño mediano, robusta, globosa y muy granulosa. Cabeza redonda y ancha. Ojos prominentes, párpados con glándulas redondeadas, hocico muy corto y boca redondeada. Tímpano no evidente, disimulado con manchas. Extremidades cortas. Dedos del pie con ancho borde cutáneo y membrana interdigital. Tubérculos subarticulares en manos y pies distinguibles. Sólo tubérculo metatarsal interno, muy desarrollado, cornificado y con el borde afilado, en forma de cuchara de albañil. Piel dorsal muy granular con cadenas glandulares. Línea vertebral amarillo claro que divide (como una nervadura principal), dos grandes manchas simétricas marrón oscuro (limbos) en forma de hoja de roble y que ocupan todo el dorso. Lateralmente presentan dos pequeñas manchas claras y oblicuas que varían de marrón amarillento a amarillo brillante y blanco. El patrón de manchas puede presentar distintas tonalidades de marrón y a veces manchas rojizas. A diferencia del escuerzo, la piel de la cabeza no posee dermostosis. Presentan una fina línea interocular, formando una cruz con la línea vertebral. Bordes labiales con líneas verticales alternadas (barrado) marrón oscuro y amarillo esfumado con marrón, que se hacen oblicuas hacia atrás a partir del ojo. Vientre muy granuloso grisáceo o blancuzco. Los machos poseen un saco vocal interno, pigmentado en la porción gular. Callosidad nupcial marrón oscura.

Canto: El canto nupcial es pulsado, grave y monótono, alternado con un sonido producido por el retorno del aire del saco vocal a los pulmones, que constituye un contrapulso. Se oye como un “guaaac... guaaac... guaaac”, muy grave y nasal, semejante a un rebuzno. Es oído a grandes distancias (más de 1.000 m). Cuando es molestado bajo la tierra (por ejemplo al desenterrarlo) emite un canto disruptivo, que posee la misma estructura pero menor duración.

Ambientes en los que habita: Común en toda la extensión de la provincia de Buenos Aires. Habita y se reproduce generalmente en ambientes abiertos. Desde selvas ribereñas, barrancas del delta, pastizales pampeanos cerca de arroyos y ambientes psamófilos como playas y dunas de la costa atlántica. Convive con las actividades humanas en los campos agrícola-ganaderos, incluso monocultivos de prácticas intensivas y extensivas.

Períodos de actividad: Se la encuentra activa en primavera y verano por su período reproductivo (septiembre a marzo), con picos bien marcados que coinciden con las grandes lluvias en la provincia de Buenos Aires (octubre y marzo) (Figura 5) Debido a sus hábitos fosoriales, permanece la mayor parte del tiempo oculta. Sólo es visible cuando migra desde sus refugios hacia el sitio reproductivo o cuando emerge, en forma de juvenil, de los charcos en donde pasó la fase de vida acuática, cruzando rutas o en el campo. Es fácil observarla en plena actividad reproductiva cantando en la charca. Es común encontrarla en las épocas que se practica el arado de los campos, ya que esto la desentierra momentáneamente. Se entierran dentro de los 20 cm superficiales de tierra.

Reproducción: Una o dos veces al año coincidiendo con fuertes lluvias (octubre y marzo) y posteriores anegaciones del campo que la obligan a salir de su refugio y desenterrarse. De esta manera comienza a comer y a desplazarse bajo la lluvia hacia los sitios de reproducción. Éstos suelen estar conformados por charcos temporarios, arroyos de primer orden o planicies de inundación de arroyos más grandes totalmente desbordados. Coincide en tiempo y espacio con la reproducción de *C. ornata*, siendo la de *Odontophrynus* mucho más frecuente que la del escuerzo. Los machos cantan enérgicamente flotando con sus cuatro patas estendidas, manteniendo su abdomen totalmente inflado, alternando de modo pulsátil el pasaje de aire entre el saco vocal y los pulmones. Suelen sujetarse de alguna planta para cantar. Lo hacen mayormente durante la noche. La actividad reproductiva posee una duración muy corta: de 24 a 72 h. Los amplexos se forman fuera del agua y luego dispersan sus huevos por el fondo de la charca.

Puesta: Entre 3.000 y 4.000 huevos que son dispersados individualmente por el amplexo en el fondo. Presentan las membranas características transparentes. Los embriones son de color negro y de tamaño mediano (1,1-1,2 mm). No poseen una envoltura común. En cuerpos de agua sin plantas, suelen dispersarse homogéneamente formando una capa. En estos casos los huevos se rodean de sedimento haciéndose casi invisibles. En caso de haber plantas, los huevos permanecen transparentes y se adhieren a la vegetación sumergida.

Larvas: Eclosionan rápidamente entre el 2º y 3º día, entre los estadios 19-21, con un tamaño aproximado de 2 mm. Cuando eclosionan son de color negro, pero al poco tiempo se aclaran y toman un color similar al del sedimento en el cual se ocultan, en la parte más profunda del cuerpo de agua. Luego de su eclosión permanecen adheridas a la vegetación o a las paredes del recipiente que las contiene durante los primeros ocho días, momento en el que alcanzan el estadio

25 de su desarrollo. A partir de entonces comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Son de hábitos bento-nectónicos y no son gregarias.

Figura 19 *Odontophrynus americanus* (escuerzo chico o escuercito)



Se las propone como carroñeras, ya que se alimentan principalmente de cadáveres de otras larvas de anuros. También se alimentan de algas y detritos. Existen larvas invernales, producto de la reproducción de marzo, que conviven con las larvas de *H. pulchellus* y *P. minutus*. Presentan tasas de desarrollo bajas, especialmente las invernales, que pueden tardar de ocho a trece meses en completar su metamorfosis. Las generaciones de primavera pueden tardar tres meses. Entre las especies estudiadas, son las de desarrollo más lento. Además, poseen una morfología y un comportamiento intermedio entre el de las especies que se reproducen en coincidencia con las grandes lluvias e invernantes, que poseen larvas nadadoras (ojos laterales, colas desarrolladas y altas, coloraciones llamativas con dibujos) que habitan sitios más estables o más profundos (*Hypsiboas*, *Scinax* y *Pseudis*), y los que explotan rápidamente ambientes más efímeros o menos profundos, con larvas más bentónicas, poco nadadoras (ojos dorsales, aletas poco desarrolladas, coloración oscura), como las de los géneros *Bufo* y *Leptodactylus*. La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 60 mm. Son globosas y de gran tamaño.

Su mantenimiento en laboratorio no presenta complicaciones si se las mantiene en bajas densidades ya sea en recipientes playos o profundos, con buena aireación. En los primeros estadios aceptan lechuga licuada o restos vegetales molidos sin inconvenientes, aumentando sus tasas de desarrollo con alimentos más nutritivos (proteínas de origen animal). Debido a sus hábitos carroñeros, se les puede ofrecer carne vacuna o de pescado sin inconvenientes. Son larvas resistentes al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 50 y 75%.

Comentarios: Debido a sus hábitos es difícil de hallar, de modo que se puede suponer que son más abundantes de lo que se considera.

Estado de conservación: Establecida como taxón indeterminado, por lo que fue categorizada como especie no amenazada.

Subfamilia *Leptodactylinae* (Werner, 1896, 1838)

Género *Leptodactylus* (Fitzinger, 1826)

Son formas estilizadas, de piel lisa y aspecto grácil. Cabeza puntiaguda. Tímpano visible. Dorso generalmente verdoso oscuro, con manchas, líneas glandulares y/o pliegues longitudinales. Miembros largos y robustos. Dedos del pie con membrana interdigital vestigial. Dientes premaxilares, maxilares y vomerianos bien desarrollados. Falanges terminales simples, delgadas. Cinco especies habitan la provincia de Buenos Aires:

Grupo Cavícola: Las especies de este grupo construyen cuevas en lugares húmedos, donde colocan sus huevos, generalmente en nidos de espuma. Los embriones pueden alcanzar un desarrollo avanzado en esta situación para pasar luego, cuando se inunda la cueva, a tener vida libre hasta alcanzar la metamorfosis. Este desarrollo fuera del agua fue denominado por Lutz (1949) cenogenético.

Leptodactylus gracilis (Duméril y Bibron, 1841) (ranita saltadora o ranita grácil)

Rana de tamaño mediano (45-52 mm) [machos: 41-52 mm; hembras: 46-52 mm].

Descripción: Aspecto grácil y estilizado. Cabeza puntiaguda con rayas longitudinales. Ojos prominentes y laterales. Tímpano grande con pliegue supratímpanico. Manos con tubérculos metacarpales redondeados, subarticulares cónicos. Patas muy largas. Tubérculos metatarsales débiles. Vientre liso, blanco amarillento, excepto en la superficie inferior de los muslos, con pliegue abdominal. Dorso liso, sin verrugas, pero con seis pliegues cutáneos longitudinales de color marrón amarillento o castaño, con cinco líneas claras, amarillentas y brillantes, que pueden llegar a blanco. De éstas, la vertebral es la más ancha y está bordeada a ambos lados con dos líneas negras delgadas que terminan en forma ahusada entre los ojos. Simétricamente, está acompañada, hacia ambos lados,

por otras dos franjas claras más finas, bordeadas cada una por una línea negra externa del mismo grosor. Todas terminan juntas en el párpado. Luego aparece un par de líneas glandulares discontinuas pegadas sobre una fina línea negra; y finalmente, las dos líneas laterales (las más externas) pasan por el pliegue supratimpánico y terminan en el medio del ojo. Lateralmente posee algunas glándulas dispersas amarillentas sobre el patrón de coloración de fondo dorsal. El hocico presenta una coloración particular con un barrado horizontal (claro-oscuro) que comienza con una franja blanca en el labio y termina con una oscura en la región loreal. Las franjas van desde el ojo al hocico. Tímpano rodeado por un anillo claro. Patas con manchas oscuras alargadas, divididas por dos líneas longitudinales blancas. Machos con región gular lateral negruzca y saco vocal simple interno.

Canto: Es un corto silbido ascendente, enérgico y repetido que recuerda la caída de una gota al agua ("buiit-buiit-buiit").

Ambientes en los que habita: En la región noreste de la provincia de Buenos Aires, desde los ambientes asociados a la costa, selvas ribereñas y barrancas del delta, hasta pastizales pampeanos típicos, agroecosistemas (incluidos los monocultivos) y espacios verdes periurbanos.

Períodos de actividad: En primavera y verano por su período reproductivo (septiembre-marzo). Durante el verano, al atardecer y durante las lluvias suelen pasar saltando velozmente entre los pastos.

Reproducción: Durante primavera-verano (septiembre a marzo), con un pico reproductivo en los meses de noviembre y diciembre. La reproducción se realiza independientemente de las lluvias. Los machos cantan desde el orificio de la cueva y callan ante el menor disturbio, por lo que son muy difíciles de hallar, aún donde abundan. La pareja en amplexo se introduce en la cueva y construye nidos de espuma.

Puesta: En nidos de espuma de color blanco que contienen alrededor de 200 huevos. Los mismos poseen las típicas membranas transparentes. Los embriones son grandes (2 mm), sin pigmento y de color amarillo claro. Es posible que presenten cuidados parentales por parte de la hembra. Ésta suele encontrarse en la cueva junto con huevos y renacuajos, y sería la encargada de mantener la humedad y abastecerlos de alimento.

Larvas: Eclosionan rápidamente entre el 2º y 3º día, según la integridad del nido de espuma, entre los estadios 19-21. Este rango puede variar, bien por desprendimientos tempranos de huevos o embriones, o bien por las larvas en estadios más tardíos que se refugiaron en la espuma. Normalmente, una vez eclosionados quedan colgando debajo del nido, del que se desprenden por movimientos natatorios. Llegan rápidamente al estadio 25, momento a partir del cual comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Son larvas poco nadadoras, poseen hábitos nectónicos-bentónicos y no son gregarias. Su tasa de desarrollo

es alta: alcanzan la metamorfosis en aproximadamente un mes. La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 30 mm.

Figura 20 *Leptodactylus gracilis* (ranita saltadora o ranita grácil)



Su mantenimiento en laboratorio no presenta complicaciones si se las mantiene en bajas densidades, ya sea en recipientes playos o profundos, con poca aireación. Aceptan lechuga licuada y otros alimentos, aumentando sus tasas de desarrollo con los más nutritivos (proteínas de origen animal). Son larvas sensibles al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 25 y 50%.

En la naturaleza, las larvas de esta especie se desarrollan un tiempo y crecen dentro de la cueva, entre la espuma. En principio, los embriones poseen mucho vitelo, y luego la hembra colocaría óvulos o huevos sin fecundar que servirían de alimento para las larvas más desarrolladas. Éstas salen a la superficie cuando, por precipitaciones o por desborde de otros cuerpos de agua, se llena el charco y la cueva queda totalmente sumergida. En este caso se comportan como las de cualquier otra especie hasta alcanzar la metamorfosis. Este cambio de medio brusco, desde la cueva hacia un charco en la superficie, puede ocurrir aparentemente en cualquier momento del desarrollo. Contrariamente, el mantenimiento en laboratorio plantea una condición extrema, condicionando una rápida disgregación del nido de espuma y un temprano desarrollo de las larvas con vida libre, sin un cambio de medio brusco como plantea su biología. Por otra

parte, este modo de vida (la existencia de nidos) impide evaluar, sin alteraciones profundas, la sensibilidad de esta especie en su fase de huevo o embrión.

Comentarios: Debido a sus hábitos es difícil de hallar, de modo que se puede suponer que son más abundantes de lo que se considera.

Estado de conservación: Aparentemente aún no está en peligro. Categorizada como especie no amenazada.

Leptodactylus latinasus (Jiménez de la Espada, 1875) (urnero, rana piadora)

Rana de tamaño mediano (28-40 mm) [machos: 28-37 mm; hembras: 30-40 mm].

Descripción: Cabeza acuminada. Hocico puntiagudo y sobresaliente. Ojos laterales. Tímpano redondo y transparente. Grueso pliegue supratimpánico que se continúa por el dorso como cadena glandular y llega a la ingle. Con glándula comisural. Mano con tubérculos metacarpales y subarticulares desarrollados. Dedos libres. Piel dorsal lisa sin pliegues longitudinales dorsales, de color grisácea o amarillada con manchas oscuras irregulares y mancha interescapular romboidal de color marrón rojizo. Flancos glandulares de color verdoso. Presentan una hilera glandular muy notoria de color amarillo claro que forma una línea a cada lado del tronco entre las extremidades. Vientre blanco con un pliegue cuadrangular abdominal. Borde posterior de los muslos amarillento y superficie inferior densamente glandular. Las extremidades presentan, dorsalmente, manchas oscuras transversales sobre un fondo que sigue el patrón de coloración dorsal del cuerpo. Machos con manchas gulares bilaterales marrón oscuras y saco vocal simple.

Canto: Suena como un piar o silbido pausado y enérgico (“fui-fui-fui”) con modulación de frecuencia. Generalmente es emitido en grupos, desde el atardecer hasta la madrugada, y eventualmente durante el día. Cuando se encuentran, macho y hembra suelen emitir un grito débil o sonido apagado. Poseen un grito de angustia, que recuerda al sonido emitido por los pichones de algunos pájaros al ser capturados por un depredador.

Ambientes en los que habita: En la región noreste de la provincia de Buenos Aires, desde los ambientes asociados a la costa, selvas ribereñas y barrancas del delta, hasta pastizales pampeanos típicos, agroecosistemas (incluidos los monocultivos) y áreas urbanas como plazas, parques y cualquier espacio verde de la ciudad o sus alrededores. Si bien se encuentra en los mismos lugares que su congénere *L. gracilis*, esta especie es más abundante.

Períodos de actividad: En primavera y verano por su período reproductivo (octubre-febrero). Durante el día se oculta debajo de troncos caídos y otros objetos o en grietas o cuevas. Al atardecer suele salir de su refugio para alimentarse o migrar hacia los lugares de cría, donde comienza a cantar.

Figura 21 *Leptodactylus latinasus* (urnero, rana piadora)



Reproducción: Durante primavera-verano (octubre a febrero), con un pico en los meses de noviembre y diciembre. Se realiza independientemente de las lluvias. Los machos se agrupan en los sitios de reproducción y comienzan a cantar desde el orificio de la cueva. Son menos tímidos que *L. gracilis*, por lo que es más fácil observarlos cantando. El amplexo se produce dentro de la cueva que ellos mismos construyen durante la noche; seguidamente colocan los huevos inmersos en una masa albuminoidea (nido de espuma) que la pareja bate con sus patas.

Puesta: En nidos de espuma de color blanco que ocupan la totalidad de la cueva y que en su interior contienen alrededor de 400 huevos. Al igual que los de *L. gracilis* poseen las típicas membranas transparentes. Los embriones son grandes (2 mm), sin pigmento y de color amarillo claro. Comienzan su desarrollo en el nido, fuera del agua, y salen de su cueva cuando se inunda debido a lluvias o desbordes de arroyos.

Larvas: Eclosionan rápidamente entre el 2º y 3º día, según la integridad del nido de espuma, entre los estadios 19-21. Este rango puede variar, bien por desprendimientos tempranos de huevos o embriones, o bien por las larvas en

estadios más tardíos que se refugiaron en la espuma. Normalmente, una vez eclosionados quedan colgando debajo del nido, del que se desprenden por movimientos natatorios. Llegan rápidamente al estadio 25, momento a partir del cual comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Son larvas poco nadadoras, poseen hábitos nectónicos-bentónicos y no son gregarias. Su tasa de desarrollo es alta: alcanzan la metamorfosis en aproximadamente un mes. La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 30 mm.

Su mantenimiento en laboratorio no presenta complicaciones si se las mantiene en bajas densidades, ya sea en recipientes playos o profundos, con poca aireación. Aceptan lechuga licuada y otros alimentos, aumentando sus tasas de desarrollo con los más nutritivos (proteínas de origen animal). Son larvas sensibles al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 25 y 50%. Merece los mismos comentarios que *L. gracilis* respecto del alejamiento de las condiciones naturales cuando se realizan ensayos de laboratorio o se las mantiene en cautiverio.

Estado de conservación: Este taxón no está en peligro de extinción y fue categorizada como especie no amenazada.

Leptodactylus ocellatus (Linnaeus, 1758) (rana criolla, rana común, rana mugidora, yuí)

Rana de gran tamaño (86-130 mm) machos: 90-140 mm; hembras: 80-120 mm.

Descripción: Rana grande, con cabeza ancha y hocico redondeado. Ojos laterales. Tímpano visible rodeado superiormente por pliegue supratimpánico e inferiormente por glándula comisural alargada. Miembros posteriores largos y cintura pectoral elevada. Pie con membrana interdigital basal y reborde cutáneo ancho. Tubérculo metatarsal interno notorio. Tubérculos subarticulares desarrollados. Notable pliegue tarsal. Piel dorsal lisa sin verrugas, pero posee de 5 a 8 pliegues longitudinales dorsales. Dorso color verdoso o marrón-amarillento. Puede presentar líneas longitudinales claras acompañando a los pliegues. Presenta muchas manchas oscuras redondeadas, bordeadas de blanco (simulan ojos), ordenadas en filas en todo el dorso y las patas. Mancha interocular en la cabeza del mismo tipo que las del cuerpo, pero de forma triangular. Glándulas femorales salientes con reborde anaranjado. Vientre liso, blancuzco, ocasionalmente con manchas oscuras o reticulado posterior amarronado. Pliegue discoidal evidente. Gránulos en la superficie inferior de los muslos con reticulado amarillo y negro. Los machos tienen un saco vocal simple e interno. Antebrazos muy desarrollados, al igual que la musculatura pectoral. Presenta dos espinas córneas en el primer dedo de la mano y gránulos queratinizados a modo de granos de arena o lija dispersos sobre el pecho. Este desarrollo diferencial de los caracteres sexuales masculinos es único entre las especies del género.

Canto: Suena como una vibración grave (un “bbbhuum” con cierto vibrato que se repite pausada y suavemente con entonación interrogativa). Recuerda al canto de

paloma (*Columba picazuro*). Cantan durante el día y la noche. Los machos son muy territoriales, lo que facilita su observación. Es conocido su canto de angustia (similar a un maullido o al llanto de un bebé) cuando son capturadas o mordidas por un depredador. Los coros reproductivos son escasos, pausados y solamente pueden oírse desde cortas distancias (hasta 50 m).

Ambientes en los que habita: En el centro y norte de la provincia de Buenos Aires, en una gran variedad de ambientes, desde los asociados a la costa, selvas ribereñas y barrancas del delta, hasta pastizales pampeanos típicos, agroecosistemas (incluidos los monocultivos). Es una rana muy asociada al agua, por lo que se la encuentra principalmente en ambientes húmedos, pastizales, pequeñas lagunas y áreas inundadas.

Períodos de actividad: En primavera y verano (septiembre-febrero). Durante el día puede ocultarse debajo de troncos caídos, rocas, entre las matas de pasto, huecos y pozos. Durante estos períodos es muy común encontrarla durante el día oculta entre la vegetación de las márgenes de distintos cuerpos de agua y que se zambulla ante el menor disturbio. En esta situación puede atraparse con cebos rojos o pedazos de carne atados a un hilo, tocando intermitentemente la superficie del agua, lo que atrae a machos y hembras muy eficazmente. Al atardecer suele salir de su refugio para alimentarse o migrar hacia los lugares de cría, en donde se alimenta de otros anuros en actividad reproductiva. Es común encontrarla por la noche a orillas de los cuerpos de agua, asechando y depredando a otros anuros más pequeños. Hiberna desde mayo a agosto en cuevas ciegas de manera individual o en conjunto con individuos de la misma o distinta especies.

Reproducción: Comienza con las primeras lluvias de la primavera, luego del período seco invernal, y abarca parte del verano (septiembre a febrero). Posee picos en septiembre y diciembre. La reproducción se realiza en cuerpos de agua someros (charcas temporarias o permanentes) generalmente en coincidencia con fuertes lluvias y el posterior aumento de temperatura por incidencia directa del sol sobre los charcos. Los machos comienzan a vocalizar desde lugares visibles ya sea desde fuera del agua o congregados a la orilla, asomando la cabeza fuera del agua. La actividad reproductiva, desde su inicio, puede durar unos 5 días. Una vez llegada la hembra y formado el amplexo, construyen, siempre durante la noche, un nido de espuma flotante en forma de anillo, generalmente en las orillas de los charcos, batiendo los pies y girando en sentido de las agujas del reloj. El macho, luego de construido el nido, permanece dentro del hueco central, posiblemente con función de cuidado parental. Luego de la oviposición, las hembras presentan cuidado parental o comportamiento epimelético.

Figura 22 *Leptodactylus ocellatus* (rana criolla, rana común, rana mugidora, yuí)



Puesta: en nidos de espuma flotantes, con forma de anillo (de 25-30 cm de diámetro), con un orificio en el centro donde habitualmente se encuentra alguno de los progenitores. Entre la espuma se encuentran entre 5.000 y 35.000 huevos que poseen las típicas membranas transparentes y pequeños embriones de color negro.

Larvas: Eclosionan rápidamente entre el 2º y 3º día, según la integridad del nido de espuma, entre los estadios 19-21. Este rango puede variar bien por desprendimientos tempranos de huevos o embriones, o bien por las larvas en estadios más tardíos que se refugiaron en la espuma. Normalmente, una vez eclosionados quedan sostenidos en la superficie del agua o de la vegetación sumergida mediante sus branquias externas. Su tasa de desarrollo inicial es lenta. Una vez disgregada la espuma y desarmado el nido, las larvas libres en el medio aumentan su tasa de desarrollo. Son larvas poco nadadoras, poseen hábitos bentónico-nectónico y son gregarias (forman cardúmenes: comportamiento allelomimético). Crecen rápidamente y su tasa de desarrollo es alta: alcanzan la metamorfosis aproximadamente en un mes y medio, coincidiendo con el

dsecamiento de las charcas. La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar longitudes de hasta 50 mm.

En el medio natural, además de su comportamiento allelomimético estas larvas solicitan cuidado (comportamiento etepimelético) raspando la piel dorsal de su madre, que corresponde realmente a su demanda (comportamiento epimelético). Los renacuajos que permanecen en cardúmenes nadan en círculos activamente, suben a la superficie a tomar aire asomando parte de su cuerpo, para luego volver a sumergirse, lo que produce, en la superficie del agua, un movimiento similar al de la ebullición. Los que se alejan del cardumen, en cambio, presentan movimientos aislados de natación.

Su mantenimiento en laboratorio no presenta complicaciones si se las mantiene en bajas densidades, en recipientes muy profundos y grandes (tanques o piletas) con mucha aireación. Aceptan lechuga licuada y otros alimentos, aumentando sus tasas de desarrollo con los más nutritivos (proteínas de origen animal). Son larvas sensibles al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 25 y 50%.

Si bien, como acabamos de mencionar, se puede lograr su mantenimiento en laboratorio⁵, éste merece las observaciones realizadas respecto de las larvas de *L. gracilis* y *L. latinasus*, en relación con el alejamiento de las condiciones naturales que se produce cuando se realizan ensayos de laboratorio o se las mantiene en cautiverio. Además, el comportamiento allelomimético y etepimelético que presentan, sumado a que poseen cuidados parentales, aleja aún más las condiciones de laboratorio de lo que ocurre en la naturaleza. Por este motivo, concluimos que el estudio de larvas de esta especie en condiciones de laboratorio no es aconsejable.

Comentarios: Especie muy común. En los períodos favorables presenta altas densidades de juveniles. Es utilizada con fines alimentarios y didácticos (mostraciones de biología, fisiología y anatomía), por lo que sus poblaciones, en lugares urbanos, suelen ser diezmadadas. Especie muy voraz, se alimenta de otros anuros y pequeños vertebrados. Presenta comportamiento de defensa, elevándose sobre sus patas e hinchándose, al igual que *C. ornata*, *B. arenarum*.

Estado de conservación: Especie comercialmente en peligro. Categorizada como especie no amenazada. En el área de estudio se ha detectado la presencia de quitridiomycosis en esta especie, asociada a ranas muertas y moribundas en 2002 (Herrera *et al.*, 2005).

Género *Physalaemus* (Fitzinger, 1826)

Ranas de tamaño pequeño a mediano. Formas caminadoras y saltadoras, gráciles o globosas. Pupila horizontal. Dedos libres. Pies con membrana interdigital reducida o ausente. Puntas de los dedos no dilatadas. En muchas especies del género existe un tubérculo tarsal interno evidente. Poseen glándulas inguinales o,

⁵ Sólo se estaría logrando la supervivencia de las larvas desde el punto de vista fisiológico, ya que no se podrían imitar las condiciones naturales.

en su ausencia, manchas que ocupan su lugar. El canto es muy característico, recuerda un maullido o llanto de bebe y posee gran intensidad. Es emitido generalmente desde el agua, con una gran expansión del saco vocal, que contrasta con el tamaño de las especies de este género. Cuatro especies habitan la provincia de Buenos Aires:⁶

***Physalaemus fernandezae* (Muller, 1926) (ranita silbadora enana)**

Rana de tamaño pequeño (17-26 mm) machos: 17-22 mm; hembras: 17-26 mm.

Descripción: Rana pequeña de aspecto grácil y delicado. Piel lisa, escasamente glandular. Sin glándulas inguinales. Líneas glandulares alargadas a los lados de la columna vertebral y detrás de la comisura bucal. Cabeza ancha. Hocico corto. Tímpano no evidente. Pliegue supratimpánico grueso. Patas cortas. Primer dedo de la mano ensanchado y oscuro. Dos tubérculos palmares (el externo más marcado). Pie con reborde cutáneo leve. Tubérculos metatarsales cónicos. Tubérculo tarsal redondo. Pliegue ventral cuadrangular. Patrón de coloración: Piel dorsal con glándulas en forma de pliegues dorsolaterales, a veces en forma de W interescapular. Coloración muy variable, con cuatro patrones principales. Patrón *reticulado simétrico*: manchas marrones claras, simétricas respecto de la columna vertebral, de contorno verde oscuro sobre un fondo verde-gris claro. Muestra una mancha triangular interocular, además de dos triángulos invertidos –uno en el dorso y otro en la región lumbar– rodeados de manchas que simulan paréntesis. Patrón *franja vertebral clara*: una franja vertebral ancha de color marrón claro-rojizo, bordeado por líneas oscuras longitudinales, sobre un fondo verde-gris oscuro. Patrón *línea vertebral clara*: línea vertebral amarillenta sobre un patrón irregular de manchas simétricas verde oscuro, sobre un fondo marrón. Patrón *difuso con línea urostilar* (menos frecuente): presenta una coloración dorsal gris uniforme con una línea urostilar blanca. Los cuatro patrones muestran un barrado oscuro sobre fondo claro en las patas posteriores. Vientre desde marfil a amarillo maíz, con un reticulado de manchas grises. En las extremidades anteriores presenta manchas longitudinales en los brazos y transversales en los antebrazos. Machos con manchas verde-oscuras en la región gular y saco vocal externo simple, que se dilata excepcionalmente para amplificar el canto.

Canto: El canto nupcial es un débil silbido agudo, acompañado de un vibrato, que recuerda al silbido lejano del viento. Se oye desde distancias relativamente cortas (entre 100 y 300 m).

Ambientes en los que habita: Es una especie rara, que se distribuye en la franja costera de la provincia de Buenos Aires. En el norte puede llegar a distribuirse más lejos de la costa. Habita y reproduce en ambientes abiertos, pastizales inundables de *Stipa* sp., con poca profundidad (entre 20 y 30 cm). Convive con las

⁶ Ninguna de éstas habita el área de estudio, pero el análisis de su sensibilidad fue incorporado a la tesis porque se lograron coleccionar puestas, aumentando así el número de observaciones de las especies de la familia *Leptodactylidae*. Además, se las consideró como grupo externo de comparación, ver Capítulo IV)

actividades humanas en campos ganaderos no muy explotados, siendo más frecuente en ambientes prístinos.

Períodos de actividad: Principalmente en invierno por su período reproductivo (marzo a septiembre), y en verano (enero-febrero) con menor frecuencia. Es una especie poco visible y difícil de hallar. Sólo se detecta en época reproductiva, por la emisión del canto.

Reproducción: Posee dos períodos reproductivos marcados. El más notorio –y que involucra un mayor número de individuos– ocurre durante los meses más fríos del año (junio-agosto) con temperaturas de hasta 2°C. Luego puede reproducirse con menor intensidad desde mediados de enero a mediados de abril, coincidiendo con las grandes lluvias. Los machos cantan flotando, desde los bordes de los cuerpos de agua o inmersos, ocultos en densos manchones de pequeños juncos o gramíneas. Cantan generalmente durante la noche, pero también de día. Los amplexos una vez formados, seleccionan un sitio cercano al lugar de donde el macho emitía el canto y construyen un nido. La construcción de nidos suele coincidir con fuertes lluvias y se extiende durante los días posteriores.

Puesta: Realizan nidos de espuma flotantes de forma esférica (2,5 a 4,5 cm de diámetro), pudiendo presentar variaciones en su forma debido a la vegetación. Cada nido suele contener entre 150 y 350 huevos con embriones blancos envueltos en sus características membranas transparentes. Los nidos son contruidos aislados o en grupos de hasta siete unidades.

Larvas: Eclosionan rápidamente entre el 2º y 3º día, según la integridad del nido de espuma, entre los estadios 19-21. Este rango puede variar bien por desprendimientos tempranos de huevos o embriones, o bien por las larvas en estadios más tardíos que se refugiaron en la espuma. Normalmente, una vez eclosionadas escapan de la espuma por debajo del nido, del que quedan colgando un instante y luego salen nadando rápidamente. Llegan al estadio 25 entre el cuarto y quinto día. Son delgadas, pequeñas (3,11 mm) y oscuras. Poseen una tasa de desarrollo rápida a intermedia: llegan a la metamorfosis a partir de un mes y medio o dos, pudiendo retrasar su desarrollo hasta 6 meses. Su longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 30 mm.

Figura 23 *Physalaemus fernandezae* (ranita silbadora enana)



Su mantenimiento en laboratorio no presenta complicaciones si se las mantiene en bajas densidades, recipientes profundos y con buena aireación. Aceptan lechuga licuada y otros alimentos, aumentando sus tasas de desarrollo con los más nutritivos (proteínas de origen animal). Son larvas resistentes al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 50 y 75%.

Estado de conservación: indeterminado.

Género *Pseudopaludicola* (Miranda Ribeiro, 1926)

Formas de muy pequeño tamaño. Presentan coloraciones crípticas y son muy ágiles. Pupila horizontal. Tímpano oculto o difícilmente distinguible. Dientes maxilares desarrollados. Piel dorsal glandular, pero sin glándulas inguinales o parches glandulares laterales evidentes, lo que las diferencia de las especies de *Physalaemus* y *Pleurodema*. Tubérculo antebraquial prominente. Dedos de la mano largos y delgados. Dedos libres, sin membrana en manos y pies. Una especie habita la provincia de Buenos Aires y se encuentra presente en el área de estudio.

Pseudopaludicola falcipes (Hensel, 1867), (macaquito)

Rana de tamaño pequeño (14-20 mm) machos: 14-17 mm; hembras: 17-20 mm.

Descripción: Rana muy pequeña con patas proporcionalmente grandes y largas. Piel dorsal con gránulos. Tímpano no visible. Pliegues glandulares en forma de X sobre la zona escapular. Pequeñas glándulas parotoides. Cabeza y hocico redondeados. Vientre liso y pliegue abdominal interrumpido o ausente. Primer dedo de la mano ensanchado y oscuro, con pequeñas espinas córneas en su borde interno. Mano con tubérculos subarticulares y metacarpales obtusos. Tubérculo antebraquial notable. Pie con membrana interdigital en la base y con reborde cutáneo. Tubérculos subarticulares cónicos y metatarsales medianos. Pliegue tarsal largo y curvado. Dedos del pie no ensanchados. Piel dorsal lisa, algo glandular. Dos pliegues cutáneos entre los hombros, en forma de X, a veces muy marcados, por pigmentación coincidente con la X o bien por ofrecer en el interior de la X una coloración contrastante. El color del dorso suele ser pardo o terroso (coloración críptica). En algunos casos (aproximadamente 20%) presenta una línea vertebral fina y clara (anaranjada-rojiza). La cabeza presenta el mismo patrón de coloración dorsal y un barrado negro sobre el maxilar, desde la parte posterior de los ojos y en todo el labio superior. Vientre liso, blancuzco, a menudo salpicado de oscuro. Dorso amarronado grisáceo con manchas oscuras, a veces con línea vertebral clara o roja. Los machos son más pequeños. Presentan un saco vocal interno que se dilata excepcionalmente para amplificar el canto (al igual que en las especies de *Physalaemus*). Línea masculina de Liu borrosa. Piel gular holgada amarillenta o anaranjada y con callosidades nupciales.

Canto: El canto nupcial es enérgico. Recuerda el sonido producido por un contador Geigero el que se produce al pasar un dedo por los dientes de un peine fino. Se oye desde distancias relativamente cortas (entre 100 y 300 m) y es particularmente penetrante al escucharlo de cerca.

Ambientes en los que habita: En la franja central de la provincia de Buenos Aires. Es una especie abundante pero no muy conspicua, dado que en los períodos en que no se reproduce permanece oculta. Habita en pastizales húmedos hidrófilos de *Paspalum* sp. y otras gramíneas, en cercanías de arroyos y campos inundados. Convive con las actividades humanas en campos agrícola-ganaderos, incluyendo monocultivos, uso intensivo y extensivo.

Períodos de actividad: Principalmente en primavera-verano por su período reproductivo (de septiembre a marzo). Hiberna de abril a septiembre. A partir de agosto o semanas antes del inicio de su reproducción, comienza a llegar a la charca y se oculta bajo objetos, grietas o semisumergida cerca de la orilla de la charca. En los picos de su período reproductivo se la suele ver caminando al sol por los pastizales inundados.

Figura 24 *Pseudopaludicola falcipes* (macaquito)



Períodos de actividad: Principalmente en primavera-verano por su período reproductivo (de septiembre a marzo). Hiberna de abril a septiembre. A partir de agosto o semanas antes del inicio de su reproducción, comienza a llegar a la charca y se oculta bajo objetos, grietas o semisumergida cerca de la orilla de la charca. En los picos de su período reproductivo se la suele ver caminando al sol por los pastizales inundados.

Reproducción: Luego de fuertes lluvias se congrega en los alrededores de la charca y pastizales inundados (con 2 a 10 cm de profundidad) y canta de manera ensordecedora durante el día (al sol) y de noche. Es una de las primeras especies en iniciar su reproducción, que se mantiene por varios días (10 o más). Los machos cantan desde el borde del agua o trepados a alguna planta, a pocos centímetros de la superficie. Los huevos se depositan adheridos a la vegetación sumergida.

Puesta: Depositán huevos esféricos de 2 mm de diámetro de manera individual en el fondo del charco. Los embriones son gris oscuro de 1 milímetro de diámetro. Las membranas son transparentes y pueden adherirse a la vegetación sumergida. La mayor parte de los huevos suelen caer al fondo de la charca rodeándose de

sedimento, que queda adherido a la superficie y los disimula en el fondo, de manera que son poco visibles desde la superficie.

Larvas: Eclosionan rápidamente entre el 2º y 3º día, entre los estadios 19-21, con un tamaño aproximado de 2 mm. Luego de su eclosión permanecen adheridas a la vegetación o a las paredes del recipiente que las contiene durante los primeros seis días, momento en el que alcanzan el estadio 25 de desarrollo. A partir de entonces comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Son larvas de hábitos bentónicos. Poseen altas tasas de desarrollo: llegan a la metamorfosis entre un mes y medio y dos meses. La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 28 mm.

Su mantenimiento en laboratorio no presenta complicaciones si se las mantiene en bajas densidades, recipientes profundos y con buena aireación. Aceptan lechuga licuada y otros alimentos, aumentando sus tasas de desarrollo con los más nutritivos (proteínas de origen animal). Son larvas resistentes al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 50 y 75%.

Comentarios: Especie muy ágil y escurridiza. Se oculta rápidamente y puede saltar distancias de hasta 1 m.

Estado de conservación: Aparentemente esta especie no está amenazada, categorizada como especie no amenazada.

Familia *Bufo*nidae (Gray, 1825; Bell, 1839)

La familia *Bufo*nidae reúne, dentro de la batracofauna argentina, un gran número de especies que encuadran básicamente en el morfotipo comúnmente conocido como “sapo”, de *distribución cosmopolita*. Los sapos son formas sin dientes, de aspecto deprimido y piel verrugosa, con grandes y notorias glándulas parotoides. Son formas básicamente caminadoras que se reproducen en cuerpos de agua esporádicos (charcas), colocando numerosos huevos pigmentados dentro de cordones gelatinosos.. En la provincia de Buenos Aires encontramos representantes de dos géneros, *Bufo* y *Melanophryniscus*. Sin embargo, en el área de estudio sólo habitan dos especies del género *Bufo*.

Género *Bufo* (Laurenti, 1768)

Este género reúne a los sapos de aspecto deprimido, verrugosos, con crestas cefálicas de desarrollo variable y grandes glándulas parotoides. Carecen de dientes y poseen órgano de Bider. Tres especies habitan en la provincia de Buenos Aires.

***Bufo arenarum* (Hensel, 1867) (sapo común, sapo grande o sapo)**

Sapo de tamaño grande (99-140 mm) [machos: 88-108 mm; hembras: 93-140 mm].

Descripción: Cabeza levemente cóncava, ancha y con hocico redondeado. Ojos prominentes. Pequeño espacio interorbital. Tímpano visible. Crestas cefálicas y crestas a lo largo del labio superior. Tubérculos metacarpales desarrollados. Piel dorsal con verrugas pequeñas con una o varias espinas córneas. Glándulas parótidas grandes y variables en tamaño y forma, pero siempre con el extremo craneal más voluminoso y una prolongación hacia atrás con glándulas verrugosas. El patrón de coloración es muy variable, sobre todo antes y después de las lluvias (respondiendo a estados fisiológicos del animal). Puede presentar una coloración uniforme marrón o verde oliváceo oscuro a gris (poco llamativo). Estas coloraciones pueden tomar tonalidades más claras y presentar manchas verde claro-amarillo. Vientre granular, de color uniforme y siempre en tonalidades claras: blancuzco, gris o amarillo verdoso. Los miembros son cortos y robustos, con dedos cortos de poca movilidad, presencia de numerosos tubérculos y desarrollo de membrana digital solo en los pies. Los machos presentan un saco vocal simple, externo y medio, de color azulado y callosidades en los tres primeros dedos de la mano. Dorso amarronado o verdoso a diferencia de las hembras, en las que es más frecuente una coloración dorsal grisácea, marrón brillante y azulada con grandes manchas marrones.

Canto: Canto nupcial monótono y metálico, audible desde gran distancia. Su sonido ("crrrr") de lejos puede confundirse con el ruido de un motor de tractor o regador de explosión. Cantan de manera continua sin interrupciones durante noche y día. Se reconocen cantos de defensa, de angustia y de comunicación y/o lluvia. El canto de defensa suena como un bufido, y generalmente se acompaña con un típico comportamiento de defensa (baja la cabeza y embiste).

Ambientes en los que habita: Es muy común en toda la extensión de la provincia de Buenos Aires. Constituye una de las especies más dúctiles y resistentes, por lo que explota una gran variedad de ambientes, incluso los más degradados o modificados. Habita desde selvas ribereñas, barrancas del delta, pastizales pampeanos cerca de arroyos, lagunas o pastizales tan modificados como agroecosistemas (incluidos los monocultivos de uso extensivo e intensivo), hasta ambientes psamófilos, como playas y dunas de la costa atlántica.

Períodos de actividad: Principalmente en primavera y verano por su período reproductivo (septiembre-abril). Durante la mayor parte del año permanece oculta. Hiberna desde junio hasta agosto. Se reproduce a principios de la primavera y en verano permanece activa, alimentándose. Se la puede encontrar a considerables distancias de los cuerpos de agua, en donde se reproduce. Cuando culminan la metamorfosis se los encuentra en grupos de altas densidades a orillas del cuerpo de agua de donde emergieron, y a medida que crecen se van dispersando por distintos refugios (grietas en la tierra, bajo troncos o piedras y cuevas

aconditionadas o propias en las que pueden agruparse), a mayores distancias del cuerpo de agua a medida que aumenta su tamaño corporal.

Figura 25 *Bufo arenarum* (sapo común, sapo grande o sapo)



Reproducción: El ciclo sexual se considera potencialmente continuo. La reproducción se produce luego del invierno (pausa necesaria), a comienzos de la primavera. Es la especie de reproducción más temprana. Comienza con el ascenso de la temperatura y el período de luz, en coincidencia con las grandes lluvias y la consecuente formación de charcos en los pastizales, charcas semipermanentes y/o el desborde de cuerpos de agua permanentes. Los machos mayores comienzan a cantar atrayendo a otros machos y guían hacia la charca a los adultos inexpertos y a las hembras. Cantan con la mitad del cuerpo fuera del agua desde las orillas o sobre cualquier objeto sumergido (generalmente trepados a gramíneas sumergidas). Se forman grandes agregados reproductivos con numerosos machos que pelean por las hembras.

Puesta: Los huevos son colocados como cordones gelatinosos (ristras) que contienen los huevos alineados individualmente, cada uno con sus cápsulas y sus embriones pequeños de color negro. Se estima que los cordones poseen 1.115 huevos promedio por metro. El tamaño total de la puesta puede alcanzar los 40.000 huevos. Los amplexos formados se sumergen y dispersan las ristas de huevos por toda la extensión del cuerpo de agua, enredando los cordones entre el

pasto y otros objetos sumergidos, al modo de los adornos de guirnaldas. Es común que los sectores elegidos para la puesta disminuyan abruptamente el nivel de agua luego de unos días y que gran parte de los huevos queden expuestos al aire, secándose y muriendo.

Larvas: Eclosionan rápidamente entre el 2º y 3º día, entre los estadios 19-21, con un tamaño aproximado de 3 mm. Luego de su eclosión permanecen adheridas a la vegetación o a las paredes del recipiente que las contiene durante los primeros ocho días, momento en el que alcanzan el estadio 25 de desarrollo. A partir de entonces comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Son larvas de hábitos bentónicos y muestran, en la naturaleza, hábitos gregarios. Poseen altas tasas de desarrollo (inicialmente lentas): llegan a la metamorfosis a partir de un mes, según la densidad, el volumen de agua y la cantidad de alimento ofrecido. La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 25 mm.

Su mantenimiento en laboratorio no presenta complicaciones. Se las puede mantener en altas densidades (debido a sus hábitos gregarios), en recipientes playos con aireación. Aceptan lechuga licuada y otros alimentos, aumentando sus tasas de desarrollo con los más nutritivos (proteínas de origen animal). Son larvas resistentes al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 50 y 75%.

Comentarios: Al ser molestado secreta una sustancia tóxica de color blancuzco, principalmente a partir de sus glándulas parotoides. Por las noches es común ver adultos comiendo los insectos que son atraídos por faroles en lugares urbanizados. Muy utilizado en prácticas de laboratorio, debido a que la inducción de su reproducción mediante hormonas se encuentra estandarizada. Presenta un reflejo hipnótico cuando se los coloca de espaldas.

Estado de conservación: Comercialmente en peligro, categorizada como especie no amenazada.

Bufo fernandezae (Gallardo 1957) (sapito de jardín)

Sapo de tamaño mediano (56-80 mm) [machos: 56-73 mm; hembras: 65-80 mm].

Descripción: Piel muy glandular, con verrugas espinosas. Cabeza angosta con notorias crestas cefálicas. Hocico corto. Parotoides pequeñas, alargadas y con verrugas aplanadas. Cresta subocular afilada siempre presente y muy variable. (Generalmente forma una línea continua, pudiendo o no estar acompañada por otra línea punteada o continua, completa o media). Dorso verdoso oscuro con línea vertebral clara verdoso-amarillenta. Piel dorsal con tubérculos cónicos espinosos. Dorso verdoso o marrón con manchas irregulares oscuras y difusas. Línea vertebral amarilla que comienza en el hocico, con un ensanchamiento en la zona interescapular. Vientre granuloso y amarillento o negruzco, más oscuro en el arranque de las extremidades. Los miembros son cortos y toscos, con verrugas y

leve reborde cutáneo. Dedos cortos y de poca movilidad. Manos con presencia de numerosos tubérculos. Pie con membrana interdigital hasta la mitad de los dedos. Tubérculos metatarsales fuertes y redondeados. Los machos presentan un saco vocal simple externo y medio, de forma ovalada, que en época reproductiva puede estar coloreado de gris oscuro y acompañado de callosidades nupciales en las manos.

Canto: Poseen un canto nupcial similar al de *B. arenarum* pero más agudo y con repeticiones más rápidas. Recuerda el canto de un grillo. Al igual que *H. pulchellus* poseen un canto de inicio, producido cuando hinchán el saco en dos etapas, haciendo un sonido corto (“cuic”) para luego emitir su canto monótono que suena como una vibración (“trrr...”). Los coros son audibles a distancias de entre 100 y 300 m. Cantan de manera continua sin interrupciones durante noche y día, congregándose numerosos machos hasta colmar la charca de huevos. Se reconocen cantos de angustia y de comunicación y/o lluvia. El de angustia, similar a un gemido corto, es emitido al presionarle una pata o al ser capturado por un predator. El de comunicación y/o lluvia es un canto corto emitido desde sus cuevas.

Ambientes en los que habita: Es muy común en la provincia de Buenos Aires, distribuyéndose preferentemente en la región noreste, asociado a la cuenca hidrográfica Paraná-Río de la Plata. Hacia el sur se encuentra en simpatria con *B. dorbignyi* en una franja de varios kilómetros. Al igual que *B. arenarum*, es una especie dúctil y resistente que habita una gran variedad de ambientes, incluso los más degradados o modificados. Presenta un sedentarismo más marcado que *B. arenarum* debido a que cava su propia cueva y sólo la abandona para reproducirse o para alimentarse luego de una lluvia. Se encuentra presente desde selvas ribereñas, barrancas del delta, pastizales pampeanos cerca de arroyos, lagunas o pastizales tan modificados como agroecosistemas (inclusive monocultivos de uso extensivo e intensivo), hasta ambientes psamófilos como playas y dunas de la costa atlántica.

Períodos de actividad: Principalmente en primavera y verano por su período reproductivo (septiembre-marzo). Durante la mayor parte del año permanece oculto en una cueva que cava con sus patas posteriores en el barro. La misma, de aproximadamente 35 mm de diámetro, posee tres tramos de 50 mm promedio cada uno, en donde el animal se oculta. Allí hiberna desde junio hasta agosto y sólo sale para reproducirse, a mediados de la primavera. Luego vuelve a su cueva, en donde permanece en el tramo más externo y se asoma al sentir vibraciones en los alrededores. Si son perturbados tapan la cueva doblando la cabeza (fragmosis). Poseen un marcado sedentarismo respecto de la cueva. Cuando recién metamorfosean se los encuentra en grupos de altas densidades y construyen pequeñas cuevas a orillas del cuerpo de agua de donde emergieron, para ir luego alejándose gradualmente, haciendo nuevas cuevas y mudándose de ellas a medida que van creciendo.

Figura 26 *Bufo fernandezae* (sapito de jardín)



Reproducción: El ciclo sexual se considera potencialmente continuo. Se produce a mediados de la primavera, llegando muchas veces a coincidir con la reproducción de *B. arenarum* y *C. ornata*. Comienza con el ascenso de la temperatura y el período de luz, luego de grandes lluvias y de la consecuente formación de charcos en los pastizales, charcas semipermanentes y/o el desborde de cuerpos de agua permanentes. Los machos migran de a cientos desde sus refugios hacia el sitio de reproducción del cual emergieron de manera simultánea. Una vez reunidos en la charca, cantan tanto de día como de noche, asomados del agua flotando y tomados de la vegetación sumergida. Al igual que en *B. arenarum* se forman grandes agregados reproductivos con numerosos machos que pelean por las hembras. Es muy común ver amplexos múltiples, con una sola hembra y varios machos. La reproducción extiende por varios días (3 a 10) dependiendo de las condiciones climáticas.

Puesta: Los huevos son colocados como cordones gelatinosos similares a los de *B. arenarum*, pero se distinguen claramente de éstos por ser más finos, con cápsulas transparentes y embriones oscuros más pequeños, y por estar dentro de cordones gelatinosos (ristras) de forma espiralada. Se estima que pone más de 10.000 huevos (Basso, 1990). Los amplexos formados se sumergen y enrollan las ristas de huevos alrededor de matas de pasto sumergidas (o cualquier objeto sumergido), formando madejas de huevos.

Larvas: Eclosionan rápidamente entre el segundo y tercer día, entre los estadios 19-21, con un tamaño aproximado de 6 mm. Luego de su eclosión permanecen adheridas a la vegetación o a las paredes del recipiente que las contiene durante los primeros ocho días, momento en el que alcanzan el estadio 25 de desarrollo. A partir de entonces comienzan a alimentarse y a nadar libremente. Son larvas de hábitos bentónicos. Poseen altas tasas de desarrollo (inicialmente lentas): llegan a la metamorfosis a partir de un mes, según la densidad, el volumen de agua y la cantidad de alimento ofrecido. La longitud total varía de acuerdo a la duración del período larval, pudiendo alcanzar hasta 15 mm.

Su mantenimiento en laboratorio no presenta complicaciones. Se las puede mantener en altas densidades, en recipientes playos con aireación. Aceptan lechuga licuada y otros alimentos, aumentando sus tasas de desarrollo con los más nutritivos (proteínas de origen animal). Son larvas resistentes al cautiverio: presentan tasas de supervivencia de entre el 50 y 75%.

Comentarios: Se alimenta principalmente de hormigas. Debido a sus hábitos migratorios asociados con el período de reproducción, a su sedentarismo, a su lentitud en la marcha y a que utiliza como sitios reproductivos las charcas artificiales que se forman a la vera de los caminos, en épocas reproductivas es común ver grandes cantidades atropelladas por automóviles en las rutas, que cruzan lenta y masivamente.

Estado de conservación: Especie aparentemente no amenazada, categorizada como especie no amenazada.

CAPÍTULO IV

Estudio detallado de la respuesta de una especie al Cr(VI)

1 INTRODUCCIÓN

Sin dudas, es fundamental para la puesta en práctica de evaluaciones de riesgo ambiental poder contar con metodologías de diagnóstico para prever efectos adversos sobre los ambientes naturales o modificados y generar conocimiento acerca de esos efectos, respuestas y alteraciones que los xenobióticos provocan en el normal funcionamiento de los distintos niveles de organización ecológica (individuo, población, comunidad, ecosistema). En particular, en el diagnóstico de la calidad del agua, existen estrategias basadas en la determinación de parámetros fisicoquímicos, bioquímicos, bioindicadores de contaminación, además de bioensayos de toxicidad a diferentes escalas en laboratorio (micro, meso o macrocosmos) o directamente estudios a campo (visualización directa de efectos, limnocorales, monitoreo). Este tipo de experimentos es considerado como una importante herramienta de diagnóstico para el estudio del impacto de diferentes contaminantes sobre la biota (Blaise, 2000; Ronco *et al.*, 2000).

En las últimas décadas, se han desarrollado múltiples bioensayos de laboratorio trabajando con organismos de distinto grado de organización y escala trófica; ya sean protozoos, animales (invertebrados, peces y anfibios) como también plantas vasculares. Además se han empleado tejidos, cultivos celulares, fracciones subcelulares o ensayos enzimáticos (Blaise *et al.*, 1988; Janessen *et al.*, 2000; Natale *et al.*, 2000; Ronco *et al.*, 2000B; Apartin y Ronco, 2001; Carriquiriborde *et al.*, 2002).

1.1 Importancia de los bioensayos como herramienta bioanalítica

Si bien el análisis fisicoquímico del agua cuantifica las sustancias tóxicas presentes en el medio acuático, no permite arribar a conclusiones sobre el efecto que estas sustancias causan sobre la biota. Los bioensayos de toxicidad constituyen una herramienta útil para estimar las concentraciones de contaminantes o las proporciones de dilución de un efluente, que causan efectos adversos sobre los organismos de prueba. Este uso de los bioensayos justifica que puedan ser considerados como herramientas bioanalíticas. La utilización de los mismos a modo de técnica de evaluación ecotoxicológica se ha difundido como instrumento válido para determinar la calidad de las aguas desde esta óptica (de la Torre, 2001; Ferrari, 1997; Demichelis, 2001; Herkovits, 2002; Ferrari, 2005; Salibián, 2006). Los bioensayos, como herramientas bioanalíticas, presentan ventajas sobre

el monitoreo químico a la hora de evaluar los efectos adversos que los contaminantes pueden causar sobre los organismos acuáticos y son de gran utilidad debido a su simplicidad y costo.

1.2 Consideraciones acerca de los bioensayos agudos de toxicidad

Como se viene mencionando, los ensayos de toxicidad en laboratorio son herramientas muy útiles en evaluaciones de calidad del agua y han sido ampliamente utilizados tanto en el sector público como en el privado de todo el mundo en las dos últimas décadas (Environment Canada, 1999; Ronco *et al.*, 2000b; de la Torre, 2002). El uso de bioensayos como herramienta bioanalítica se restringe a un reducido número de especies para las cuales se han desarrollado protocolos de laboratorio estandarizados por organismos internacionales tales como: U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), American Society for Testing and Materials (ASTM), Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Environment Canada, AOAC, ISO, entre otros. Estos organismos de protección ambiental y de estandarización han concentrado la elaboración de sistemas de diagnóstico, base para la generación de estrategias ecosistémicas de protección. Ello se orienta a la obtención de respuestas estandarizadas de laboratorio (bioensayos) que permitan asegurar dentro de un grado de confiabilidad, la medida obtenida (Ronco *et al.*, 2004).

La aceptación de estos protocolos por parte de la comunidad científica y los organismos de gobierno, permitió la realización de numerosas pruebas con una gran cantidad de productos industriales y sustancias químicas de distintos orígenes. El gran número de publicaciones facilitó el establecimiento de niveles de sensibilidad de las especies ensayadas y la selección más rigurosa al evaluar la practicidad y factibilidad de estos ensayos, ofreciendo un producto minuciosamente elaborado, de fácil desarrollo y ampliamente utilizable. Consecuentemente, la disponibilidad de estas metodologías influyó de manera negativa en el desarrollo de nuevas alternativas. Si bien muchas de las especies utilizadas poseen una amplia distribución, existen muy escasos protocolos para las especies neotropicales y las especies autóctonas de nuestro país. Esto último plantea un problema a la hora de evaluar el impacto de una sustancia o efluente sobre algún ecosistema acuático de esta región (otra de las utilidades de la realización de bioensayos de toxicidad).

1.3 La necesidad de generar protocolos con especies autóctonas

Al examinar el párrafo anterior se puede concluir que para poder tomar decisiones apropiadas a la hora de evaluar el impacto de las actividades humanas sobre los sistemas acuáticos locales se plantean diversas limitaciones. Existe en primera instancia, la necesidad de generar información básica sobre especies autóctonas, para luego poder generar herramientas bioanalíticas y sus procedimientos de

aplicación. Las mismas facilitarán el desarrollo de protocolos estandarizados para especies autóctonas y neotropicales, con los que se puedan abordar problemas de impacto local o regional producidos por fuentes de contaminación puntuales o difusas.

Hace ya varios años, Ronco y Bulus Rossini (1994) mencionaban que la incorporación de bioensayos en el monitoreo de sustancias tóxicas en Argentina pronto requeriría, entre otros aspectos, del desarrollo e instrumentación de metodologías adecuadas y adaptadas a nuestras necesidades, selección de organismos de prueba a utilizar y puntos finales en los ensayos, niveles de organización sobre la base de su localización geográfica, etc. Como menciona de la Torre (2001), la legislación ambiental argentina vinculada a las aguas continentales y de residuos no permanece ajena a esta necesidad y contempla la posibilidad de incorporar estas y otras herramientas a ese ámbito. Al respecto, desde hace algunos años la ley Nacional de Residuos Peligrosos, junto a la Ley de Residuos Especiales de la Provincia de Buenos Aires y sus Decretos Reglamentarios, establecen por primera vez lineamientos más precisos en la elaboración de evaluaciones ecotoxicológicas, incorporados en forma de Anexos a los cuerpos legales. En ellos se hace referencia a la evaluación de toxicidad aguda, patogenicidad e infectividad de las muestras a analizar y se menciona la utilización de especies autóctonas en los ensayos de evaluación.

De la Torre (2001) menciona entre sus conclusiones haber demostrado la adaptabilidad de los diferentes estadios de vida de larvas premetamórficas de *Bufo arenarum* como organismos de prueba para la realización de bioensayos de toxicidad acuática. Por otra parte destaca que el protocolo de los bioensayos agudos desarrollado con esta especie, incluyó una verificación interna de la sensibilidad de los organismos de prueba mediante la evaluación de su respuesta a tóxicos de referencia. También considera que los resultados obtenidos generaron una valiosa herramienta de diagnóstico de la calidad de aguas continentales con técnicas originales de bioensayos que pueden ser incorporadas en las futuras nuevas versiones y/o actualizaciones de los cuerpos legales regulatorios de nuestro país. También se considera que si bien existe información que contribuye con elementos objetivos al diseño de protocolos con bioensayos que sirvan para evaluaciones de calidad y riesgo ecotoxicológico acuático, éstas, al igual que otras investigaciones desarrolladas en la Argentina¹, están realizadas con embriones y larvas de *Bufo arenarum*; sólo una de las 26 y 171 especies que habitan la Provincia de Buenos Aires y la república Argentina, respectivamente.

De lo antedicho, se deduce que es necesario continuar realizando investigaciones en esta línea, tomando la información que se desprende de estas investigaciones como base, y generando información comparable con las otras especies. De este modo se podrá contar con una herramienta bioanalítica de mayor intervalo de validez (al incluir larvas de diversas especies), que permita seleccionar con funda-

¹Existe un protocolo desarrollado por Perez-Coll y Herkovitz (Perez-Coll, *et al.* 1999) que fue publicado en la revista Gerencia Ambiental y confusamente “validado” en publicaciones posteriores de reconocido nivel académico.

mentos las especies más apropiadas para cada caso de estudio. Ello, luego de recabar información con las experiencias acumuladas, proponer nuevas especies como organismos de prueba, o en caso de poder hacerlo, especies indicadoras o centinelas de posibles problemas ambientales.

1.4 El estudio de sensibilidad en las ranas

Los anfibios anuros han sido propuestos en muchos casos como organismos centinelas o indicadores, ya que como mencionamos en la introducción, su ciclo de vida complejo, sumado a sus características particulares, permite recibir influencias directas e indirectas por parte de los contaminantes químicos, produciendo una gran variedad de efectos, ya sean letales o subletales (efectos sobre el crecimiento y desarrollo) en embriones, larvas y juveniles. Según Feder (1992), las interpretaciones generadas sobre la sensibilidad de los anfibios, derivó de un *pool* de información creado a partir de unos pocos miembros de las familias *Ambystomatidae*, *Pipidae*, *Bufo* y *Ranidae*. Dentro de estas familias, sin considerar a las salamandras, tenemos a *Xenopus laevis*, un miembro de la familia *Pipidae* ampliamente estudiado, utilizado como modelo para muchos procesos ecológicos y especie de prueba del protocolo FETAX aceptado y estandarizado por la ASTM (ASTM, 1991; Bantle *et al.*, 1996). Dentro de la familia *Ranidae* las especies estudiadas incluyen a *Rana catesbeiana*, *Rana pipiens* y *Rana temporaria*. Dentro de la familia *Bufo*, las especies más estudiadas fueron *Bufo americanus*, *Bufo bufo* y *Bufo marinus*. Todas ellas son muy frecuentes y conocidas, y fueron aceptadas como especies representativas y al ser tan ampliamente estudiadas en cuanto a su biología, fisiología, anatomía y otros aspectos generales, sirvieron de base para los estudios toxicológicos. Sin embargo, su representatividad respecto a la diversidad de anuros en escala global es cuestionable.

Esta misma situación se dio en Argentina con el estudio del sapo común *Bufo arenarum*, con el que se realizaron numerosos estudios evaluando la respuesta tóxica de sus larvas en distintos estadios de desarrollo, frente a diversos xenobióticos. Entre otros, se pueden mencionar los realizados por Anguiano *et al.* (1994), Llamas *et al.* (1985), Perez-Coll *et al.* (1985), Venturino *et al.* (1992). Las larvas de este animal en particular han constituido una herramienta biológica muy útil de evaluación y estandarización de bioensayos agudos de toxicidad, y su metodología fue utilizada para la determinación de índices de letalidad de metales pesados (Ferrari *et al.*, 1993) e insecticidas (Salibián, 1992), además de aplicaciones en campo para evaluar la calidad de agua (de la Torre, 2001; Ferrari, 1997; Demichelis, 2001; Herkovits, 2002; Ferrari, 2005; Salibián, 2006). En ambos casos, estas investigaciones permitieron el avance en nuestro país del conocimiento científico en el campo de la ecotoxicología mediante numerosos estudios.

Al analizar estos párrafos se advierte que el estudio de la sensibilidad de los anuros ha sido abordado mediante diseños experimentales con relativamente

pocas especies respecto a la diversidad de este grupo. Por lo que los resultados y las interpretaciones que se desprenden de los mismos, poseen fuertes limitaciones al realizar extrapolaciones o generalizaciones hacia el resto de los anuros y anfibios. Si además consideramos la opinión de Burkhart (2003), quien menciona que debido a que la gran mayoría de los estudios relacionados con contaminantes en anfibios han sido realizados mediante el enfoque de la toxicología acuática clásica², al analizar los datos acumulados hasta la actualidad, es probable que los efectos nocivos de contaminantes químicos sobre las especies de anuros estudiadas estén siendo subestimados.

1.5 La variabilidad de la herramienta analítica empleada

Como se menciona en la introducción del Capítulo I, uno de los huecos de la investigación está constituido por falta de consenso en cuanto a las metodologías de laboratorio, a la hora de considerar a los bioensayos de toxicidad como una herramienta bioanalítica estandarizada. La existencia de esta variabilidad metodológica en los diseños experimentales utilizados puede ser un motivo que limite concretar comparaciones válidas y lograr interpretaciones inequívocas, a la hora de comparar e interpretar los resultados provenientes de los bioensayos con anuros.

Junto con el desarrollo de estas herramientas analíticas estandarizadas, que requieren para su validación el contar con resultados confiables y reproducibles, se abordaron desde muy temprano estudios que intentan identificar los factores que influyen sobre la variabilidad en la respuesta de los bioensayos y la magnitud de esta variabilidad que determina ya sea la toxicidad de una sustancia o la sensibilidad de una especie. Como conclusión de estos estudios se ha identificado varios factores que modifican la toxicidad y consecuentemente los resultados de los bioensayos. Sprague, (1995) define como factor modificante (*modifying factor*) a cualquier característica de un organismo o del agua que lo rodea, que afecte la toxicidad de un contaminante, clasificando a su vez a estos factores en bióticos y abióticos.

La exactitud de los bioensayos sólo se puede medir entre los realizados sucesivamente o simultáneamente. Cuando un experimento es repetido, los resultados no coinciden exactamente. Una pequeña parte de esta variación es ocasionada por verdaderos factores aleatorios, como ser las diferencias en la resistencia dentro del grupo de organismos expuestos (discutidas mas adelante junto al concepto **IED**). Según Sprague, (1995) gran parte de la variación ocurrida en los bioensayos aún no ha podido ser explicada y la otra parte de esta variación se adjudica a factores modificadores relacionados con las variaciones en el diseño experimental.

² Este autor considera que al aplicar los lineamientos de la toxicología acuática, solo se emplearon ensayos con compuestos puros en condiciones altamente controladas de laboratorio, no contemplando los múltiples escenarios de interacciones fisicoquímicas que se dan en la naturaleza.

1.5.a Variación no explicada

La magnitud de la variación no esperada, que forma parte del error experimental, ha sido ampliamente ilustrada por una gran diversidad de experimentos meticolosos que arrojan cuantificaciones de esta variación en diferentes situaciones. Las formas más comunes de medirla están expresadas mediante el coeficiente de variación (en adelante CV), como porcentaje o como factor de variación (en adelante FV), que sería la razón entre el límite superior de estimación y el menor. (EC, 1999).

Brown (1968) calculó un FV de 2,5 veces. Adelman y Smith (1976) reportan un CV de 6, lo que equivale a un FV de 1,3, hasta un FV de 5 veces o más. Fogels y Sprague (1977) realizaron una revisión de esta problemática y propusieron que la variabilidad entre laboratorios, considerando la variación entre las LC50 estimadas se puede aproximar en un FV de 10 veces. Según EPA (1989) la magnitud posee un FV promedio de 4,9 veces, mientras que Dixon y Sprague (1981) proponen FV's de 1,39 como pequeñas variaciones, y hasta 5,5 veces como máximas, siendo aceptable un FV de 5 veces para la variabilidad intralaboratorio y de 10 veces para la variabilidad interlaboratorio (Sprague, 1995). Según el informe EPS 1/RM/134(EC, 1999), ensayos realizados en condiciones de laboratorio controladas muestran CV's entre laboratorios de un 13% llegando a 30 y 50%, siendo en la mayoría de los casos menor al 30%, coincidiendo con los resultados de otros estudios (Rue *et al.*, 1988). Para ejemplificar, un CV de 30% estaría indicando un FV de 4 veces, por ejemplo 10 mg/L entre 5 y 20 (ENVCAN, 1999), y esto a su vez estaría indicando un porcentaje de variación de aproximadamente 50% en los resultados.

Al llegar a este punto podemos definir como *valores aceptables*³ y considerados de buena precisión o valores relativamente bajos, a variaciones de entre el 10 y 20%, que indican FV's entre 1,2 y 1,9 y CV's menores al 15%. Coincidentemente, son varios los autores que llegan a conclusiones similares (Buikema *et al.*, 1982; Nebeker, 1982; Qureshi *et al.*, 1982; Grothe y Kimerle, 1985; Pickering, 1988; USEPA, 1991 y EC, 1999)

1.5.b Variación explicada

Dentro de los factores modificadores de la toxicidad, Sprague (1995) identifica a los factores bióticos como un grupo de factores que ha recibido considerablemente menos atención que el grupo de factores abióticos en cuanto a su papel en el aporte de variabilidad de los bioensayos. Entre los factores modificadores bióticos se encontrarían: las especies utilizadas como organismos de prueba, su estadio de vida y su tamaño, la nutrición, la salud y el grado de parasitismo y el proceso de aclimatación a las condiciones de ensayo. Luego consideraría dentro del grupo

³ Esta conclusión será considerada como uno de los criterios de aceptación en la interpretación de resultados del presente trabajo de tesis

de factores modificadores abióticos a distintas propiedades fisico-químicas del agua: dureza, pH, oxígeno disuelto y salinidad.

1.6 Algunas consideraciones sobre los factores modificadores de la toxicidad

En este ítem se realizan algunas consideraciones sobre los factores que modifican la toxicidad y consecuentemente los resultados de los bioensayos, con el objetivo de mostrar las bases teóricas utilizadas para generar algunas de las hipótesis particulares de este capítulo, adoptando la clasificación efectuada por Sprague (1995). Respecto a la variabilidad generada por las especies utilizadas como organismos de prueba, el autor menciona a este factor como existente entre grupos de organismos sin dar demasiadas precisiones. No define claramente a qué se deberían las diferencias en la sensibilidad entre especies, refiriéndose a entidades poco precisas expresando que “existen diferencias reales entre distintos grupos de organismos”, o de otra manera, que “el tipo de organismo de ensayo tiene una influencia fundamental sobre los datos ecotoxicológicos”, donde no define las características de estas entidades ni explica el porqué de su variación. Parte de la variabilidad entre organismos podría estar asociada a: características de las especies de índole fisiológicas, genéticas, biológicas, hasta características ecológicas, geográficas y filogenéticas (en relación con la *categoría sistemática*), entre otras. Esta falta de precisión se reitera en la literatura ecotoxicológica, donde no se define claramente cual de los atributos de las especies es el que aporta a la variabilidad en las respuestas de los bioensayos.

La idea general de la variabilidad entre especies mediante la comparación de datos fue revisada por Klapow y Lewis (1979) y luego por Spear y Pierce (1979), quienes evalúan diferencias en la toxicidad de peces, siendo algunas especies 15 veces más tolerantes al cobre que otras. Meister y Van Den Brink, (2000); Kooijman, (1987), mencionan la *historia de la población* de donde se extrajeron los animales, como un factor modificador importante. Aquí estarían involucrados los aspectos de comportamiento y adaptación al medio según los cambios ocurridos en el tiempo, además de considerar que las variaciones geográficas y genéticas de una población dada, resultarían en diferencias en la sensibilidad de las muestras o grupos de organismos ensayados (Bridge *et al.*, 2003). No desconociendo esta problemática, consideran como decisiva la incorporación de la *variación genética* en los estudios ecotoxicológicos, quizás el factor más ignorado y todavía crítico, para describir y entender las variaciones de las tolerancias entre poblaciones de anuros y dentro de poblaciones de una misma especie. Además, hay que considerar importante en este aspecto la historia de exposición a contaminantes de la población estudiada, que podría haber sufrido selecciones o impactos en la variabilidad genética.

El estadio de vida y el tamaño fueron considerados en principio para artrópodos acuáticos, relacionados con el tiempo de muda (Buikema, 1979). Luego, para

peces, se estableció que los estadios más sensibles eran los de embriones y larvas y los estadios juveniles más tempranos de vida (Mc Kim, 1977), en coincidencia con los supuestos básicos de la toxicología acuática (Burkhart, 2003). Sin embargo, Sprague (1995), menciona que según estudios realizados por Anderson y Spear (1980), no parecería existir una relación entre el tamaño y la toxicidad, pero propone una explicación razonable para esta relación modelizada para ensayos agudos de letalidad como $LC50 = a W^b$, donde los parámetros a y b deberían ser calculados empíricamente mediante la relación lineal entre W y $LC50$ para cada grupo de datos evaluados. Este modelo se basaría en la explicación de que la tasa metabólica peso-específica, en el caso de los peces, disminuye con el tamaño, por lo que peces pequeños metabolizarían más tóxico que los de mayor tamaño. Por otra parte, la metabolización del tóxico sería más efectiva en los peces de mayor tamaño. Numerosos estudios indican para el caso de los anuros, que los renacuajos son más sensibles a los contaminantes que los huevos y que los juveniles y adultos post-metamórficos (Anguiano *et al.*, 1994; Berrill *et al.*, 1993; 1994, Bidwell y Gorrie 1995; Mann y Bidwell 1999). Sin embargo, estudios que examinan la sensibilidad de las larvas a lo largo de su ciclo de vida, muestran que la relación entre la sensibilidad y el estadio de vida no sigue una tendencia clara (Howe *et al.*, 1998; Natale *et al.*, 2000), lo que indica que hasta el momento las evidencias no son suficientes para elaborar modelos predictivos confiables (Burkhart, 2003).

Los factores nutrición, salud y parasitismo fueron poco estudiados, pero en general responden de una manera esperable. La salud de los individuos es un factor determinante de sus condiciones de resistencia a los contaminantes. En contraposición, aquellos individuos que se encuentran en peor estado, enfermos o parasitados, muestran una mayor vulnerabilidad.

Respecto a la nutrición, Sprague (1995), menciona algunos estudios en los que se midió el estado de nutrición como cantidades de proteínas u otras moléculas orgánicas en el hígado de los individuos. Los diferentes estudios mostraron de manera general una relación directamente proporcional entre el estado de nutrición de los individuos y la tolerancia a un determinado tóxico, entre 1 y 6 veces, dejando ver que el estado de nutrición es de gran importancia entre los factores de modificación de la toxicidad. Por esta razón, a la hora de diseñar un ensayo de toxicidad, la dieta será una variable a tener en cuenta, siendo preferibles aquellas con mayores contenidos proteicos (ya que brindarían una mejor condición o un mejor estado).

Los tiempos de aclimatación fueron ampliamente estudiados, principalmente en cuanto a la temperatura y a la concentración de oxígeno disuelto (en adelante OD), (Fry, 1947, 1971). También se realizaron estudios que contemplaron la aclimatación a otros factores (contemplados aquí como factores abióticos de modificación de la toxicidad), como el pH, la dureza e incluso los tóxicos. Al parecer los individuos expuestos generan respuestas (mecanismos de defensa) pudiendo adaptarse, generando de esta manera factores de variación de 2 ó 3 veces en la tolerancia a un tóxico. Pero aquí ya se involucrarían otros temas e

hipótesis, como por ejemplo el hecho de que la exposición temprana a un tóxico determinado realizaría una selección genética de tolerancias y homogeneizaría la respuesta de la muestra estudiada.

Dentro de los factores abióticos (temperatura, OD, pH, sales disueltas, sólidos suspendidos y dureza), la temperatura y la dureza están estrechamente relacionadas con la toxicidad de los metales, aunque los factores modificadores más importantes serían el pH y la alcalinidad. La temperatura, OD, sales disueltas y dureza, no modifican demasiado la toxicidad, manteniéndose su variación dentro de un intervalo aceptable, con valores máximos de FV de 2 ó 3 veces. La dureza es la excepción a esta tendencia, ya que estudios realizados utilizando metales pesados (Ni, Pb, Zn, Cd, Cu), muestran la existencia de relaciones lineales positivas entre la dureza total del agua y la sensibilidad de los organismos prueba estudiados expresada como LC50, siendo las especies expuestas 1 orden de magnitud más sensibles en agua blanda que en agua dura. La mayor parte de estos estudios muestran como el pH y la alcalinidad provocan variaciones en esta relación general, dependiendo esto último de las distintas formas o “especies iónicas” en que se encuentran los metales estudiados, bajo las diferentes condiciones fisicoquímicas del agua de ensayo (Sprague, 1995). Newman (2003) modelizó esta relación proponiendo la siguiente ecuación: **punto final de toxicidad = a dureza^b** donde los parámetros **a** y **b** deberían ser calculados empíricamente mediante la relación lineal entre la dureza del agua y el punto final de toxicidad elegido para cada grupo de datos evaluados (Ej: LC50).

Estos factores en su totalidad formaron parte de los factores fijados como condiciones controladas de laboratorio en el presente trabajo de tesis. Los mismos fueron descritos en el ítem 3.5. del Capítulo III: “Caracterización fisicoquímica del agua”, además de presentarse la justificación de la elección en el ítem 2.1.c: “Diseño de experimento” (Ver más adelante).

1.7 Conclusión

Al llegar a este punto, podemos concluir que existe la clara necesidad de generar estudios ecotoxicológicos que empleen el mayor número de especies posibles, con una metodología que contemple tanto a los factores que actúan intrínsecamente sobre la variabilidad de la herramienta analítica empleada, como a los factores modificadores - bióticos y abióticos - que actúan sobre la respuesta final estudiada. Esta metodología debería incluir la posibilidad de comparación, por medio de pruebas de significancia, de la sensibilidad estimada a partir de las diferentes especies o agrupamientos experimentales utilizados. Por otra parte, si se logra estandarizar procedimientos para especies autóctonas, éstos deberían contemplar escenarios de exposición más realistas respecto al problema de contaminación planteado. Sólo de esta manera estaríamos en condiciones de generar un nuevo *pool* de información elemental para poder abordar la discusión acerca de la posibilidad de emplear a los anuros como indicadores o centinelas de

la contaminación. Como todo avance en ciencia básica, además de servir para pasos posteriores o aplicables, generar esta información nos aportaría conocer más acerca de la sensibilidad de los anuros y su susceptibilidad a los distintos agentes contaminantes o estrés químico (*chemical stressors*).

En el marco conceptual antes descripto, el presente capítulo cubre la evaluación de la sensibilidad de huevos, embriones y larvas de *Hypsiboas pulchellus* al Cr(VI) bajo diferentes condiciones de ensayo, en exposiciones agudas y crónicas; la variabilidad no esperada en la respuesta de esta especie a lo largo de toda la fase de su vida acuática frente a diferentes condiciones controladas de laboratorio; la contrastación de distintas hipótesis respecto a los factores modificadores de la toxicidad sobre larvas de *H. pulchellus* en bioensayos de toxicidad aguda; el desarrollo de una serie de pasos metodológicos, base para realizar la estandarización de este bioensayo y determinación de la sensibilidad de la especie. Se describen además los procedimientos metodológicos asociados al diseño, ejecución, análisis e interpretación de los bioensayos utilizados, dejando de lado los aspectos vinculados con los efectos del cromo como contaminante ambiental y el desarrollo de la evaluación de sus efectos sobre la comunidad estudiada. Ambos puntos son motivo del próximo capítulo (Capítulo V) y se profundizan en los ítems 1.5 “Clasificación de especies” y 1.6 “Efectos del Cromo”.

1.8 Hipótesis y objetivos

1.8.a Hipótesis de la tesis que involucran este capítulo:

- **H1:** Las especies de anuros estudiadas son organismos adecuados para la realización de bioensayos en laboratorio. En este capítulo se enuncia específicamente: “Las larvas de *H. pulchellus* son organismos adecuados para la realización de bioensayos en laboratorio”.
- **H2:** La contaminación por cromo afecta la fase de vida acuática de los anuros estudiados.
- **H3:** El cromo hexavalente a bajas concentraciones es tóxico para las larvas de anuros estudiadas.
 - **Pr3:** El intervalo de concentraciones de cromo en el que se observan efectos letales (0-100%) se encuentra a bajas concentraciones, en el orden de las partes por millón (mgCr(VI)/L).
- **H4:** Existe un incremento de efectos perjudiciales, producidos por el Cr(VI) que se correlacionan positivamente con el aumento de la concentración del tóxico en el agua.
 - **Pr4.1:** Concentraciones muy bajas inhiben el crecimiento.

- **Pr4.2:** Concentraciones subletales medias producen malformaciones y afectan el desarrollo.
- **Pr4.3:** Concentraciones subletales altas producen la muerte de los organismos expuestos.
- **H8:** La exposición a Cr(VI) a concentraciones constantes tiene mayores efectos a medida que se aumenta el tiempo de exposición al que son sometidos los renacuajos

1.8.b Hipótesis específicas de este capítulo:

- **H4a:** Los ensayos propuestos de *H. pulchellus* poseen una variabilidad aceptable y una alta precisión, por lo que son adecuados para el desarrollo de una herramienta bioanalítica.
- **H4b:** Las distintas poblaciones de *H. pulchellus* poseen diferentes sensibilidades.
- **H4c:** Las larvas de *H. pulchellus* extraídas de un mismo ambiente presentan diferentes respuestas a lo largo del año.
 - **Pr4c1:** Las larvas invernales de *H. pulchellus*, poseen menor sensibilidad que las larvas primaverales.
- **H4d:** Los renacuajos de *H. pulchellus*, disminuyen su sensibilidad al cromo a medida que aumentan su estadio de desarrollo (STD).
 - **Pr4d:** En las larvas de *H. pulchellus* el estadio de vida crítico (CLS) es el estadio 25.
- **H4e:** Los renacuajos de *H. pulchellus* disminuyen su sensibilidad al cromo a medida que aumentan su edad.
- **H4f:** Los renacuajos de *H. pulchellus* disminuyen su sensibilidad al cromo a medida que aumentan su tamaño.
- **H4g:** La dureza del agua afecta de manera inversamente proporcional a la sensibilidad de las larvas de *H. pulchellus*.
- **H4h:** El agua utilizada en los ensayos propuestos no presenta diferencias significativas con el agua propuesta para los ensayos FETAX, respecto a su influencia sobre la sensibilidad al cromo de la especie estudiada.

- **H4i:** La sensibilidad al cromo de las larvas de *H. pulchellus* no difiere significativamente de la de las larvas de *X. laevis*, organismo prueba de los protocolos estandarizados FETAX.
- **H4j:** El procedimiento de renovación diaria de medio de ensayo (semi-estático), no presenta diferencias significativas con el procedimiento de no recambio de medio (estático), respecto a su influencia sobre la sensibilidad al cromo de la especie estudiada.
- **H4k:** Las exposiciones prolongadas permiten obtener información complementaria detallada sobre la sensibilidad de larvas de *H. pulchellus* respecto de los ensayos de toxicidad aguda.
- **H4l:** Las larvas expuestas tempranamente a concentraciones subletales de cromo poseen la capacidad de modificar su performance (tasas de desarrollo y crecimiento).

1.8.c Objetivos específicos de este capítulo:

- Realizar ensayos agudos y crónicos con *H. pulchellus*. con el objetivo de conocer la sensibilidad de esta especie en su fase de vida acuática al Cr(VI).
- Establecer las condiciones de ensayo y la metodología adecuada, que permitan la comparación de la sensibilidad entre especies o agrupamientos realizados, según las condiciones de ensayo, al Cr(VI).
- Estimar las curvas dosis-respuesta (en adelante curvas D-R) para las distintas situaciones propuestas y calcular los distintos parámetros toxicológicos propuestos.
- Detectar las distintas fuentes de variación que afectan la sensibilidad de una puesta utilizando bioensayos de toxicidad aguda en laboratorio y medir la magnitud del efecto de estas variaciones en la respuesta de esta especie.
- Seleccionar entre las técnicas estadísticas más utilizadas en esta disciplina, un procedimiento - conjunto de técnicas combinadas - que permita la resolución de los bioensayos y la comparación de los resultados obtenidos en los diferentes bioensayos, mediante pruebas de significancia.
- A partir de esta metodología, contrastar las diferentes hipótesis planteadas (H4a-H4l) según los resultados obtenidos, e interpretar la información de manera integral.

- Evaluar el efecto de la exposición prolongada a 25 concentraciones (subletales y letales) de Cr(VI) sobre el crecimiento, el desarrollo y la supervivencia de larvas de *H. pulchellus*, expuestas en dos momentos distintos de su desarrollo (huevos STD8-10, 16h) y larvas (STD25, 176h) hasta su metamorfosis (STD46, 1272h).
- Evaluar el efecto subletal del Cr(VI) sobre el crecimiento, el desarrollo y la supervivencia de larvas de *H. pulchellus* expuestas a una solución de 9 mg Cr(VI)/L, durante su desarrollo a partir de cuatro estadios (9, 25, 37 y 41) hasta la metamorfosis, en condiciones controladas de laboratorio.
- A partir de la interpretación y discusión de los resultados obtenidos, seleccionar las condiciones adecuadas para realizar bioensayos de toxicidad con larvas de *H. pulchellus* y considerar su posible uso como herramienta bioanalítica.

1.8.d Supuestos específicos de este capítulo acerca de la metodología de ensayo propuesta:

- Los huevos y larvas obtenidos a partir de la metodología de extracción propuesta, no sufren ningún tipo de cambio que modifique su comportamiento natural, por lo que serían representativos de su desarrollo en la naturaleza.
- Las larvas de anuros se pueden desarrollar exitosamente en las condiciones de laboratorio planteadas, exhibiendo los mismos patrones de desarrollo descritos para condiciones naturales.
- Los huevos y larvas obtenidos a partir de la metodología propuesta, una vez en el laboratorio, estarían libres de las presiones de selección negativas que actúan sobre ellos en condiciones naturales (parasitismo, depredación, enfermedades, radiaciones UV y contaminación química).
- Según el diseño experimental planteado y las condiciones de laboratorio controladas, no existe ningún factor que esté afectando negativamente el normal desarrollo de los individuos (huevos, embriones, larvas).
- El factor a evaluar (Concentración de Cromo(VI) en agua) se plantea como un posible factor negativo fijo⁴

⁴ Considerando la denominación introducida por Eisenhart, 1947 “fixed-effects and random-effects”, “Model I” y “Model II” para el análisis de la varianza, utilizados mas tarde por Zar, 1999.

2. METODOLOGIA

Se realizó un total de 28 bioensayos de toxicidad aguda (Tabla 1). Si bien todos los ensayos tuvieron una metodología común original, ésta se fue modificando en el transcurso del estudio a partir de la obtención de nuevos resultados, hasta establecer un procedimiento metodológico consensuado (en adelante metodología propuesta de ensayo), a partir del ensayo número 15, respecto al total de bioensayos realizados en esta investigación (n=58). Esta metodología propuesta fue el punto de comparación asumido como válido, para contrastar las diferentes hipótesis planteadas y cumplir con los objetivos establecidos en el presente trabajo de tesis.

Tabla 1 Bioensayos realizados

	Ens Nº	Fecha	Estadio	Edad	Archivo	Clasificación <i>a priori</i>
1	1	26-mar-98	22-25	85	HP260398EPB	PRELIMINAR 1
2	2	27-mar-98	22-25	109	HP270398EPA	PRELIMINAR 2
3	3	1-abr-98	22-25	168	HP010498DEPX	PRELIMINAR 3
4	4	6-abr-98	25	144	HP060498SEPC(FI)	PRELIMINAR 4
5	5	21-may-98	30	1.320	HP210598SEPC(FII)	DEFINITIVO 1
6	6	23-oct-98	25	120	HP231098SEP(FI)	PRELIMINAR 5
7	7	23-oct-98	25	120	HP231098SEP(FIII)	PRELIMINAR 6
8	10	7-feb-99	8-10	24	HP070299E	DEFINITIVO 2
9	12	12-feb-99	25	140	HP120299E(FII)	DEFINITIVO 3
10	13	12-abr-00	25	120	HP120400SEP7	DEFINITIVO 4
11	14	5-sep-02	25	264	HP5090296ALLP	DEFINITIVO 5
12	15	6-nov-02	25	240	HP6110248ALLP	ESTANDARIZADO 1
13	21	9-abr-03	25	152	HP90403SEP131	ESTANDARIZADO 2
14	22	9-abr-03	25	158	HP090403EP134	ESTANDARIZADO 3
15	23	10-abr-03	25	158	23HP96+3+60	ESTANDARIZADO 4
16	24	14-abr-03	27	279	HP140403SEP134	ESTANDARIZADO 5
17	25	14-abr-03	26	277	HP140403SEP133	ESTANDARIZADO 6
18	26	14-abr-03	25	257	HP140403SEP139	ESTANDARIZADO 7
19	27	5-may-03	28	800	HP50503SEP133	ESTANDARIZADO 8
20	28	12-may-03	8-10	16	HP120503P145(FI)	ESTANDARIZADO 9
21	29	19-may-03	25	152	HP190503SEP145(FII)	ESTANDARIZADO 10
22	34	17-may-04	25	588	HP140504SEP176	ESTANDARIZADO 11
23	43	16-mar-05	25	159	HP160305SEP216A	ESTANDARIZADO 12
24	44	16-mar-05	25	159	HP160305SEP216B	ESTANDARIZADO 13
25	45	6-abr-05	25	159	HP060405SEP222(1)	ESTANDARIZADO 14
26	46	6-abr-05	25	159	HP060405SEP223(A)	ESTANDARIZADO 15
27	47	6-abr-05	25	159	HP060405SEP223(B)	ESTANDARIZADO 16
28	48	25-abr-05	27	619	HP250405SEP222(2)	ESTANDARIZADO 17

La contrastación de cada hipótesis requirió de un diseño experimental particular que se detalla en el ítem 2.1.e: "Variaciones del diseño experimental". En la Tabla 2, se muestran las comparaciones realizadas entre las diferentes curvas D-R estimadas.

Este ítem se encuentra dividido en una primera parte: - Bioensayos de toxicidad - donde se dan a conocer las características de los bioensayos realizados, su diseño, el procedimiento establecido y los criterios de aceptación de resultados.

Una segunda parte: - Análisis de datos - se dedica completamente a las cuestiones matemáticas y estadísticas relacionadas con la fundamentación de la elección de las técnicas utilizadas, su aplicación y su interpretación.

2.1 Bioensayos de toxicidad

2.1.a Fuente de organismos:

La obtención de huevos en laboratorio se realizó por medio de los métodos descritos en el Capítulo III: Método A - “cosecha de amplexos”, Método B - “inducción artificial”, Método C - “inducción hormonal” y Método D - “recolección directa de puestas”. (ver ítem 4.2.b₁ Capítulo III para más detalle).

En la Tabla 3 (página subsiguiente) se muestra el origen de las puestas ensayadas, y algunas características que fueron utilizadas como variables de agrupamiento (localidad, charca, mes, estación) para evaluar la influencia de los factores bióticos sobre la sensibilidad de las larvas de *H. pulchellus*.

Tabla 2 Hipótesis planteadas y comparaciones realizadas

Hipótesis	Denominación	Curvas D-R	Diseño	Método	Hipótesis nula
H4a	Hipótesis de Variabilidad Total	Todas (ver tabla 4.5)	Todos	comparación de regresiones lineales	Todas las a son iguales Todas las b son iguales
H4b	Hipótesis Poblacional	E13-E21-E23-E29-MOL4344-FRI4546	FRI-PIL-ARR-MOL-BRY-ATA	comparación de regresiones lineales	Todas las a son iguales Todas las b son iguales
H4c y Pr4c1	Hipótesis Estacional	FRI4546 y E6	invierno-verano	prueba de "t" de diferen-cia de medias	Las medias son iguales
		MOL4344 y MOL1214	invierno-verano		Las medias son iguales
		E21 y E15	invierno-verano		Las medias son iguales
		FRIS4546 y E6	invierno-verano	comparación de regresiones lineales	a4546=a6
		MOL4344 y MOL1214	invierno-verano		b4546=b6
		E21 y E15	invierno-verano		a4344=a1214 b4344=b1214 a21=a15 b21=b15
H4d,Pr4d,H4e,H4f	Hipótesis de Desarrollo(DET)	E10 y E12	STD8-10, 16h vs STD25, 140h (etapa I)	comparación visual	LC50-E10=LC50-E12
		E28 y E29	STD8-10, 16h vs STD25, 176h (etapa I)		LC50-E28=LC50-E29
		E23 y E26	STD25, 158h vs STD28, 257h (etapa II)	comparación de regresiones lineales	a23=a26 b23=b26
		E22 y E24	STD25, 158h vs STD27, 279h (etapa II)	prueba de "t" pareado	Las medias son iguales
		E24, E25 y E26	STD27,279h vs STD26,277h vs STD25, 257h (etapa II)		a24=a25=a26 b24=b25=b26
		E45 y E48	STD25, 159h vs STD27, 619h (etapaIII)	comparación de regresiones lineales	a45=a48 b45=b48
		E21 y E27	STD25, 152h vs STD28, 800h (etapa III)		a21=a27 b21=b27
		E4 y E5	STD25, 144h vs STD30, 1320h (etapa IV)		a4=a5 b4=b5
		E25 y E27	STD26, 277h vs STD28, 800h (etapa V)		Las medias son iguales
				prueba de "t" pareado	a25=a27 b25=b27
H4g	Hipótesis de Dureza	E46 y E47	agua dura-agua blanda	comparación de regresiones lineales	a46=a47 b46=b47
H4h	Hipótesis FETAX 1	E43 y E44	agua FETAX-agua ensayo	comparación de regresiones lineales	a43=a44 b43=b44
H4i	Hipótesis FETAX 2	E50 y MOL4344	Especie FETAX(<i>X.laevis</i>)-esp.estudiada(<i>H.puchellus</i>)	comparación de regresiones lineales	a50=a4344 b50=b4344
H4j	Hipótesis de Estaticidad	E21 y E22	semiestático-estático	comparación de regresiones lineales	a21=a22 b21=b22

Tabla 3 Origen de las puestas utilizadas

Ens N°	Estacionalidad			Origen		
	Mes	Estación	Estacionalidad	Localidad	Charca	Población
1	3	2	1	6	7	MOL
2	3	2	1	6	7	MOL
3	3	2	1	6	7	MOL
4	3	2	1	6	7	MOL
5	4	2	1	6	7	MOL
6	10	4	2	2	3	FRI
7	10	4	2	2	3	FRI
10	2	1	2	6	7	MOL
12	2	1	2	6	7	MOL
13	4	2	1	3	11	ATA
14	9	4	2	6	7	MOL
15	10	4	2	5	15	ARR
21	4	2	1	5	18	ARR
22	4	2	1	5	16	ARR
23	4	2	1	2	14	PIL
24	4	2	1	5	16	ARR
25	4	2	1	5	16	ARR
26	4	2	1	2	14	PIL
27	4	2	1	5	16	ARR
28	5	2	1	6	9	BRY
29	5	2	1	6	9	BRY
34	4	2	1	6	6	MOL
43	3	2	1	6	7	MOL
44	3	2	1	6	7	MOL
45	3	2	1	2	3	FRI
46	3	2	1	2	3	FRI
47	3	2	1	2	3	FRI
48	3	2	1	2	3	FRI

Referencias:	COD. charca	Charca	Cod. Loc.	Localidad
	1	Boca Cerrada	1	Punta Lara
	2	Aeroclub, calle 7 y 610	2	Aeropuerto
	3	Frison, calle 7 y 653	2	Sicardi
	4	Barrio, calle 10 y 658	2	Sicardi
	5	Charca 640 y 12	2	Sicardi
	6	Charca A	6	Correa
	7	Charca B	6	Correa
	8	Arroyo	6	Correa
	9	Charca Berny	6	Correa
	10	Poyero	3	Atalaya
	11	Balneario	3	Atalaya
	12	Arroyo, Reserva Pearson	4	Punta Indio
	13	Ch. Physa, Reserva Pearson	4	Punta Indio
	14	Pileta Natale	2	Sicardi
	15	Molino Maizal	5	Arrecifes
	16	Charca 7 km	5	Arrecifes
	17	Sitio Uno	5	Arrecifes
	18	Charca Aeroclub	5	Arrecifes

POBLACIÓN	
ARR	LOC 5
ATA	LOC 3
BRY	LOC 9 CH 9
FRI	LOC 2 CH 3
MOL	LOC 6 CH 6 y 7
PIL	LOC 2 CH 14

MES	COD. MES	ESTACIÓN	ESTACIONALIDAD
ene	1	1	2
feb	2	1	2
mar	3	2	1
abr	4	2	1

may	5	2	1
jun	6	3	1
jul	7	3	1
ago	8	3	1
set	9	4	2
oct	10	4	2
nov	11	4	2
dic	12	1	2
<p>CÓDIGO ESTACIÓN: 1 verano 2 otoño 3 invierno 4 primavera</p> <p>CÓDIGO ESTACIONALIDAD: 1 invernall 2 estival</p>			

2.1.b Selección de organismos de ensayo:

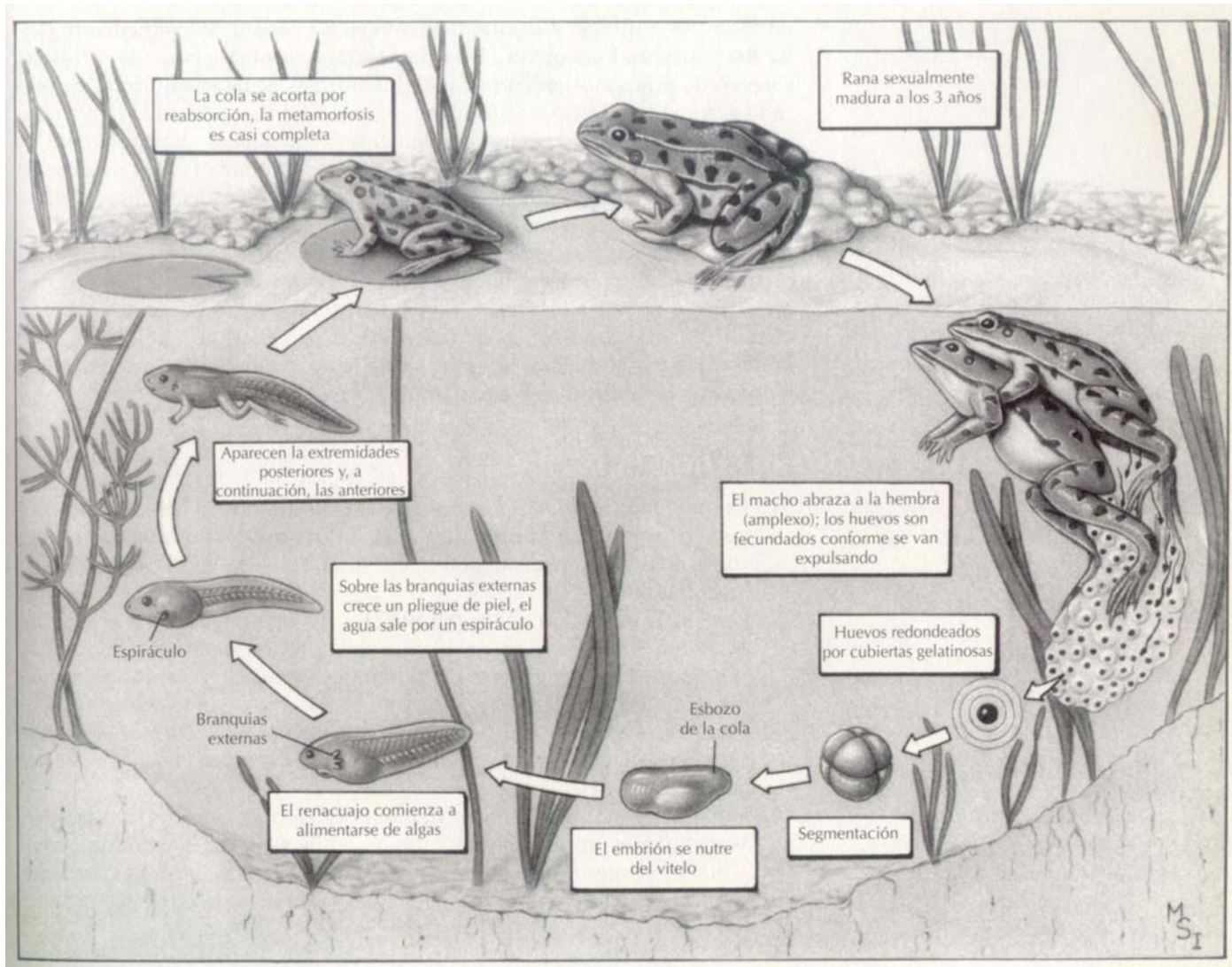
Las puestas, una vez en el laboratorio, fueron aclimatadas durante 48h, dejándolas reposar en los recipientes donde fueron colocadas. Luego de este período se procedió a la selección de los huevos fertilizados, desechando los no viables. Una vez finalizada esta selección, los huevos se colocaron en acuarios, continuando su aclimatación bajo condiciones controladas de laboratorio. Durante esta etapa y hasta su utilización en los bioensayos, los huevos, embriones y larvas fueron controlados diariamente, midiendo sus tiempos de desarrollo y tasas de crecimiento, apartando del lote de organismos a ensayar, aquellos embriones que presentaban malformaciones o anomalías notorias en el crecimiento o en el desarrollo. Una vez alcanzado el estadio de desarrollo determinado según los objetivos del experimento, se procedía a su distribución de manera aleatoria en los recipientes de ensayo según el diseño experimental.

2.1.c Diseño Experimental:

2.1.c₁ Determinación de las condiciones de laboratorio

Las condiciones de laboratorio seleccionadas como factores fijos, se determinaron a partir de estudios bioecológicos previos (Item 4.2.b₃, Capítulo III), información proveniente de la literatura (Sprague, 1995, McDiarmid, 1999, Sparling, 2000) y observaciones provenientes de los estudios realizados en campo (Item 4.1, Capítulo III).

Figura 1 Ciclo de vida de los anuros



La elección del estadio de desarrollo (en adelante estadio o STD) y consecuentemente la edad a la cual fueron expuestos los renacuajos, se fundamentó desde el punto de vista biológico, en los acontecimientos ocurridos durante el desarrollo del ciclo larval (Figura 1 y Figura 2). Según McDiarmid (1999), el período de desarrollo comprendido entre los estadios 1 y 25, que implica un 17% de su fase de vida acuática, es de transición entre una forma relativamente inmóvil (embrión) hacia una activa y comedora (renacuajo). A partir del estadio 25 las larvas poseen una forma definida y estable (forma de renacuajo), comienzan a alimentarse e inician la fase de vida libre, que implicará un 58% de su fase de vida acuática. Esta morfología se mantendrá sin cambios relevantes hasta el comienzo de la metamorfosis, período crucial de grandes cambios, donde el renacuajo pierde sus características larvales y adopta las estructuras propias del adulto, que implica un 25% de su fase de vida acuática. Por ello, a partir del estadio 25, los

renacuajos ya eclosionados adquieren una morfología fácil de identificar, que mantendrán sin cambios relevantes hasta la crisis metamórfica y debido a que aún poseen reservas de energía, relictos del desarrollo embrionario (vitelo), esto les permite sobrevivir un tiempo (5-10 días) en buenas condiciones antes de comenzar a desmejorarse por falta de alimentación.

Desde el punto de vista toxicológico, si bien no se pueden obviar estos detalles, el estadio 25, al ser la etapa más temprana de la forma larval, estaría propuesta según los principios de la toxicología acuática, como la etapa más sensible (Burkhart, 2003). A esto se le suma la simplicidad que permite la ausencia de alimentación en los bioensayos, conservando un buen estado en los individuos durante la exposición. Por otra parte, existe una gran homogeneidad respecto al tiempo en que todos los huevos de una misma puesta se desarrollan hasta alcanzar el estadio 25. Además de los tamaños y las formas, vemos que son varias las razones para seleccionar este estadio *a priori*, como el más apropiado para la realización de este tipo de bioensayos. Esta elección guarda, al igual que la hipótesis propuesta **H4c** y **Pr4c**, una relación implícita con la aproximación denominada estadio crítico de vida (*critical life stage*) (en adelante CLS), aplicada para casos de protección de la naturaleza, que se basa en conocer el estadio más sensible del ciclo de vida de un organismo, para elegirlo como estadio seguro a partir del cual se pueden estimar las sensibilidades de los demás estadios de vida (Newman y Unger, 2003).

La variable tiempo o edad (en días) queda condicionada a la velocidad de desarrollo en que cada puesta de cada especie o población alcanza el estadio 25. Se conoce que de todos los parámetros físicos la temperatura es el que posee efectos más dramáticos sobre la fisiología, la ecología y el desarrollo de las larvas de anuros. Los límites de tolerancia de temperatura de cada especie, están generalmente asociados a la distribución geográfica de las mismas (Ultsch *et al.*, 1999). Según este autor, al considerar larvas de 18 especies en las que se han realizado estudios de tolerancia a la temperatura, el intervalo entre los límites de tolerancia - definidos como valor crítico mínimo y máximo por Cowles y Bogert (1944) - para una misma especie es grande, aproximadamente entre 0 y 40°C para la mayor parte de las especies estudiadas, siendo el promedio de los valores de temperatura preferida por el cuerpo (PBT, Reynolds y Casterlin, 1979) para estas especies de 26,39°C.

Figura 2 Tabla de los distintos estadios de vida propuestos por Gosner (1960)

Figura 2.a

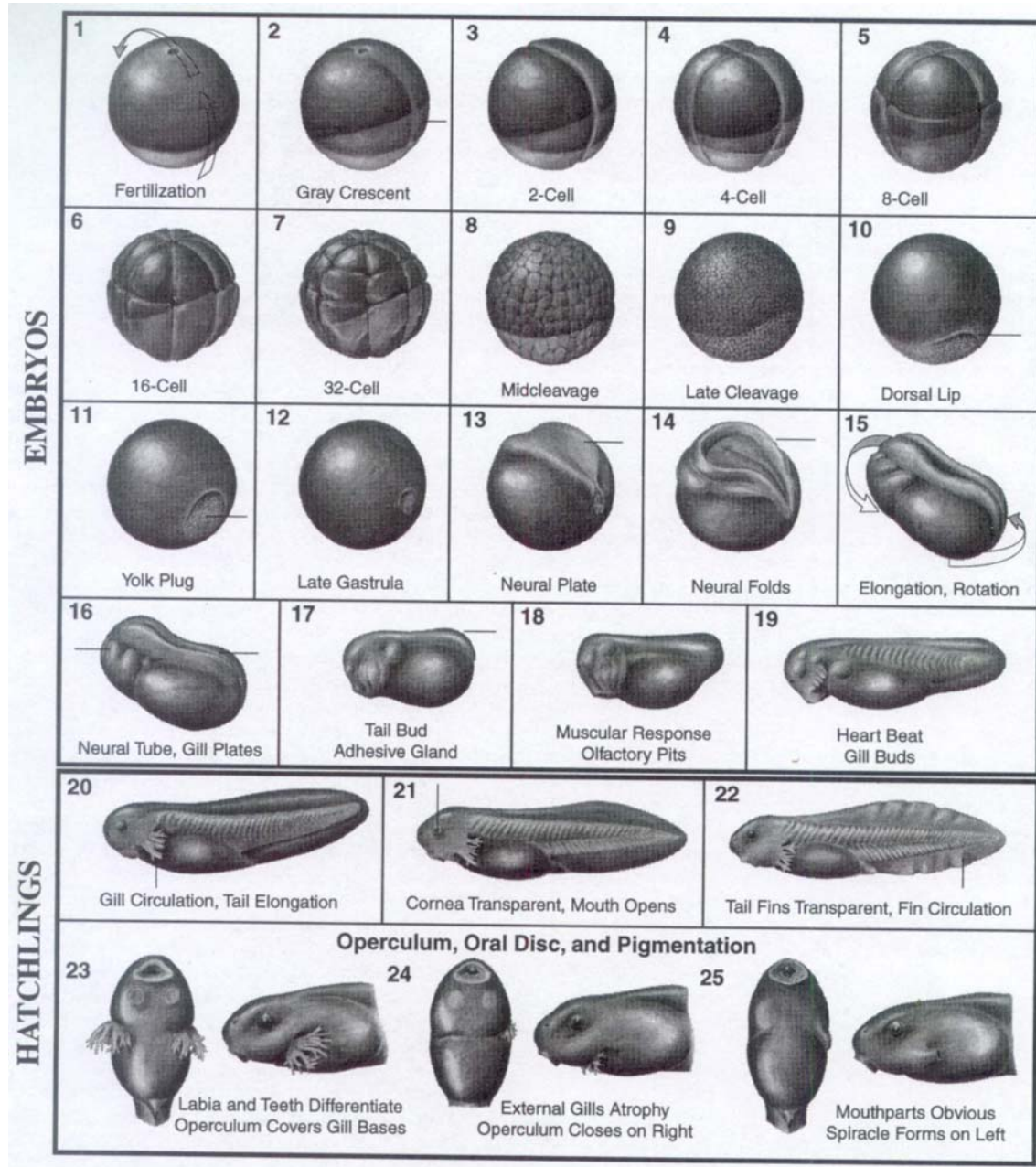
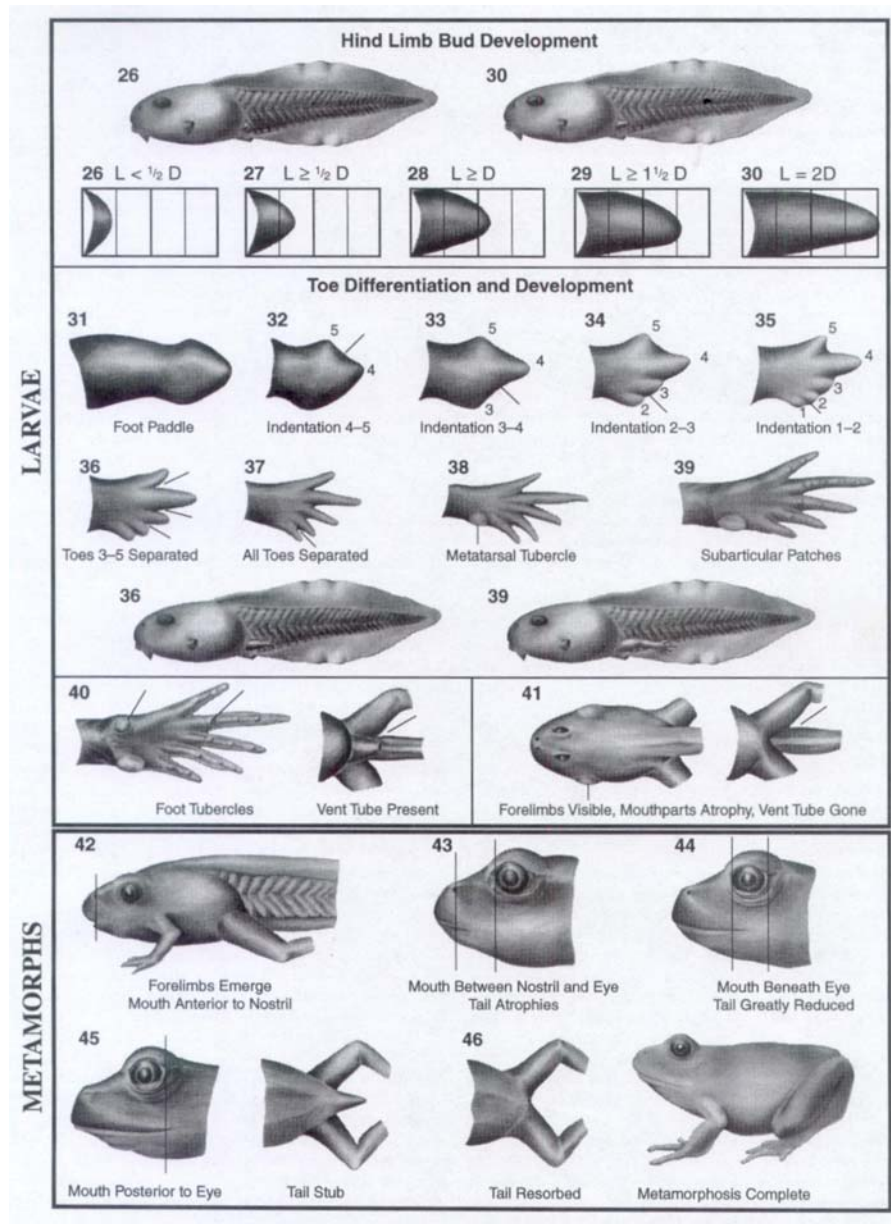


Figura 2.b



Si consideramos los valores promedio de PBT antes mencionados y que la mayor parte de las especies a estudiar se reproducen en primavera-verano, sumado al hecho de que la temperatura promedio de la región estudiada para esta estación es de 24°C; y que por otra parte se conoce, a partir de resultados obtenidos de mantener larvas en condiciones de invierno y verano, que las larvas de verano exhiben ciclos más cortos y mayores tasas de supervivencia, se determinó la selección de una temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 16:8 h de luz y oscuridad, respectivamente, con la intención de simular las condiciones de verano que ocurren en el área de estudio. Además, se encontraron fundamentos en este

sentido en diversos trabajos citados en libros de índole tanto biológica (Feder, 1992; Duellman, 1994; McDiarmid, 1999) como ecotoxicológica (Rand, 1995; Sparling, 2000; Linder, 2003).

El pH y la dureza no fueron fijados, ya que dependieron del pretratamiento del agua de red (dependiendo de variaciones por parte de la empresa distribuidora o fuente de provisión) y de un mínimo tratamiento asociado con el procedimiento de ensayo que intentó ser conservativo, de manera que no se modificaran significativamente las condiciones originales. Por ello éstos, al igual que otros parámetros de calidad de agua considerados en el Item 3.5 del Capítulo III (ver para más detalle), sólo se monitorearon con el objetivo de detectar variaciones respecto a los límites normales o aceptables, propuestos en la bibliografía (USEPA, 1989, Environmental Canada, 1999; Ronco *et al.*, 2004). En algunos casos se adopta el uso de agua de red debido, además de su practicidad y disponibilidad inmediata, a la exigencia en el cumplimiento de normas de calidad que deben practicarse en su provisión para el consumo humano, las que en la mayor parte del mundo están consensuadas, y las empresas distribuidoras deben cumplir a través del control de parámetros de calidad. Esto asegura, para su uso alternativo en laboratorio, que las características fisicoquímicas permanezcan relativamente estables durante gran parte del año para una misma fuente de provisión. Además de considerarse esta estabilidad de las características del agua, luego se la comparó con las propiedades fisicoquímicas encontradas en campo en los sitios estudiados (ver ítem 3.5 del Capítulo III: “Caracterización fisicoquímica del agua de red y de los sitios de muestreo”).

La decisión de circulación y filtrado del agua fue producto de prueba y error entre los distintos sistemas de filtrado ofrecidos en el mercado para solucionar problemas de arenas y sedimentos (mallas de acero e hilo envuelto), sarro (sales de polifosfato), cloro y compuestos orgánicos (carbón activado), dureza (resinas de intercambio iónico), bacterias (filtro cerámico), entre otros, y su efecto en las propiedades fisicoquímicas del agua. Debido a la presencia de impurezas y concentraciones de algunos metales como Fe y Pb principalmente, presentes en el agua de red producto de la infraestructura del establecimiento, se seleccionó el procedimiento de dejar correr el agua por un tiempo no inferior a los 20 minutos y luego filtrarla por un filtro físico de 5 micras, antes de su reposado y aireación. Ese procedimiento disminuía por debajo del límite de detección las distintas concentraciones de metales presentes en el agua y eliminaba las impurezas que frecuentemente llegaban a los tanques de reposo y aireación en los que se preparaba el agua de ensayo.

La selección del sistema de eliminación de cloro (un residuo no deseado de las aguas pretratadas), fue producto de los buenos resultados obtenidos a partir de la aireación enérgica y continua de tanques con agua reposada durante distintos tiempos: 24-48-72 y 96 h, frente a la opción de utilizar productos químicos con distintas formulaciones comerciales denominados “declorinadores”, utilizados en acuicultura, manteniendo el mismo criterio conservativo respecto a las propiedades fisicoquímicas del agua, utilizado en la extracción de impurezas. Se deter-

minó como parte del procedimiento propuesto, la aireación por burbujeo continuo y enérgico durante un tiempo mínimo de 48h.

2.1.c₂ Diseño experimental general de los bioensayos agudos

El diseño experimental general consistió en realizar bioensayos de toxicidad aguda, en condiciones controladas de laboratorio (Figura 3) (temperatura = $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, fotoperíodo = 16:8; pH = 7,65-8,30, dureza = 250 mg $\text{CO}_3\text{Ca/L}$), utilizando agua de red filtrada por un filtro de 5 micras, reposada y decolorada mediante burbujeo continuo durante 48h.

Para describir la metodología se tomó como ejemplo una planilla de ensayos completa (Figura 4, página siguiente), proveniente de una de las pruebas realizadas, “ensayo número 43”, con larvas de *H. pulchellus* en estadio 25. En esta planilla se registraron los datos obtenidos de la puesta y de la lectura de cada bioensayo. Una vez finalizado el mismo, esta información fue transcrita a una base de datos.

En cada ensayo de toxicidad se prepararon 15 concentraciones [0,5; 1,5; 3; 6; 9; 12; 15; 18; 21; 24; 27; 30; 33; 36 y 60] mg Cr(VI)/L y dos grupos control; las exposiciones se realizaron por cuadruplicado.

Cada dilución se preparó a partir de una solución madre de 1000 mg Cr(VI)/L, utilizando agua de ensayo y dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) de grado analítico (Merck). Luego de la exposición las concentraciones nominales de Cr(VI) fueron confirmadas por espectrofotometría de absorción atómica, con un límite de detección de 0,01 mg/L. Como recipientes de ensayo se utilizaron envases transparentes de polipropileno de 500 ml de capacidad, 12 cm de diámetro y tapa del mismo material. En cada recipiente se colocaron 5 individuos y las diferentes diluciones de dicromato de potasio. (Figura 5, páginas subsiguientes).

Figura 3 Condiciones controladas de laboratorio

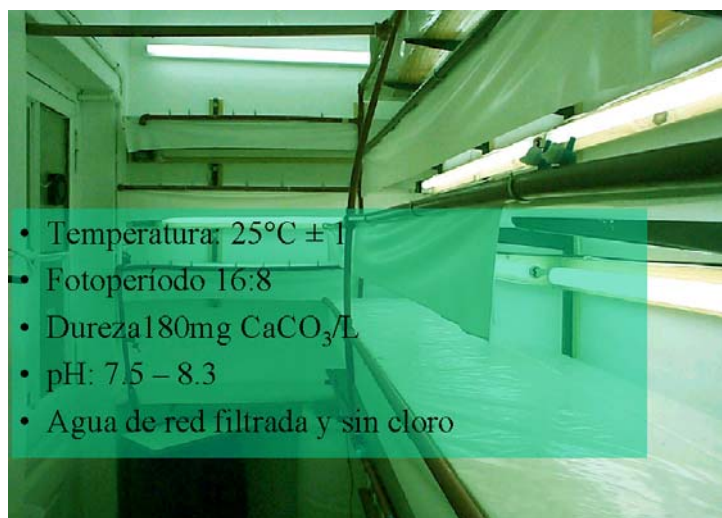


Figura 4 Planilla de ensayo utilizada como parte del diseño experimental general propuesto

Especie = *Hypsiboas pulchella*

HP160305SEP216A

Tabla de ensayo

Hora	20																							
Fecha	16-Mar-05																							
	AGREGAR	□ en ppm	n=	24 hs					48 hs					72 hs					96 hs					
				1	2	3		NºR	1	2	3		NºR	1	2	3		NºR	1	2	3		NºR	
M1	1	0,5	5	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	4	5	5	1	
M2	3	1,5	5	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	4	5	5	1	
M3	6	3	5	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	4	5	1	
M4	12	6	5	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	4	5	1	
M5	18	9	5	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	3	2	5	5	5	3	2	
M6	24	12	5	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	4	5	3	4	4	
M7	30	15	5	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	4	5	5	1	4	4	4	5	3	
M8	36	18	5	5	5	5	4	1	4	5	5	3	3	4	4	3	3	6	2	3	1	2	12	
M9	42	21	5	5	5	5	5	0	4	4	5	4	3	3	4	4	3	6	2	2	0	1	15	
M10	48	24	5	4	4	5	5	1	3	4	5	3	5	2	1	4	2	11	0	0	0	1	19	
M11	54	27	5	5	5	5	5	0	3	3	2	5	7	0	2	2	5	11	0	1	0	0	19	
M12	60	30	5	5	5	5	5	0	2	3	3	4	8	2	0	2	3	13	0	0	1	0	19	
M13	66	33	5	5	5	5	5	0	2	1	2	3	12	1	0	0	0	19	0	0	0	0	20	
M14	72	36	5	5	4	5	5	1	3	0	2	1	14	1	0	1	0	18	0	0	0	0	20	
M15	120	60	5	4	4	5	5	2	0	0	0	0	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	20	
Blanco 1	0	0	5	5	5	5	5	0	5	5	5	5	4	1	5	5	5	4	1	5	5	5	4	1
Blanco 2	0	0	5	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	3	2	

Tóxico:

Edad:

Replicados:

Estadio:

Origen:

Cr. (VI)

159HS

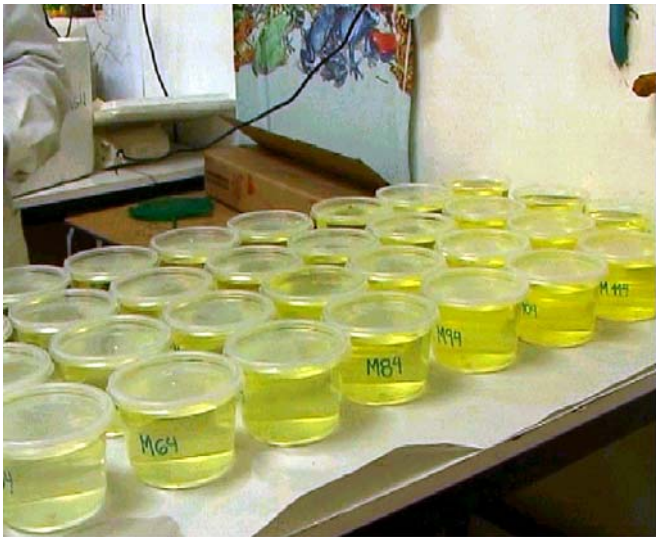
4

25

P=216/107

Ensayo Semi-Estático
Temperatura 25°

Figura 5 Fotos de ensayo con cromo





Según la renovación del medio los ensayos resultaron semiestáticos, con cambio total de medio cada 24 h, momento en el cual se registraba la mortalidad, retirando los individuos muertos y fijándolos en una solución de formaldehído 10% para posteriores análisis de malformaciones e inhibición de crecimiento. La mortalidad fue determinada mediante observación visual de inmovilidad luego de punzar suavemente los renacuajos con una varilla de vidrio. A las 96 h, luego de la lectura final, todos los individuos, una vez identificados, se fijaron en solución de formaldehído 10% para posteriores análisis de malformaciones e inhibición de crecimiento.

2.1.c₃ Diseño experimental de los bioensayos crónicos

Se realizaron dos bioensayos de toxicidad crónica, utilizando la misma metodología. El mantenimiento de los individuos se efectuó en condiciones controladas de laboratorio utilizadas en los ensayos agudos (Figura 3), con el agregado de aireación continua. Los ensayos se llevaron a cabo en cámaras de ensayo anteriormente descriptas para los ensayos agudos. El medio fue reemplazado por completo una vez por semana y todas las concentraciones evaluadas incluyeron cuatro réplicas por concentración y controles negativos. Todos los individuos fueron alimentados con lechuga licuada *ad libitum* justo antes de la renovación del medio. Las particularidades del diseño experimental de cada uno de los experimentos se describen a continuación:

Experimento I: A partir de una puesta de 1200 huevos, previa eliminación de los no fertilizados, se los dividió en dos grupos iguales. Uno de los grupos (embriones de 16 h, 8-10 de Gosner) fue usado inmediatamente para un ensayo de toxicidad aguda como ensayo de referencia 1 (E28). El segundo fue mantenido en laboratorio durante 176 h hasta que los organismos alcanzaron el estadio 25 de Gosner, para ser luego expuesto al tóxico en las mismas condiciones que el primer grupo (E29), ensayo de referencia 2. Ambos ensayos de toxicidad fueron realizados empleando 25 concentraciones de Cr(VI), que incluían el rango de

concentraciones letales y subletales esperadas para las 96 h: 0,001; 0,005; 0,010; 0,050; 0,100; 0,250; 0,500; 0,750; 1,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 18,0; 21,0; 24,0; 27,0; 30,0; 33,0; 36,0; 39,0; 60,0; 90 mg/L. Los organismos fueron expuestos a las concentraciones de entre 3 y 90 mg Cr(VI)/L (exposiciones agudas) correspondientes a los ensayos (E28 y E29); a las 96 h fueron fijados en solución acuosa de formaldehído 10% v/v. Los individuos de ambos grupos, expuestos a las concentraciones de entre 0,001 y 2,0 mg Cr(VI)/L se emplearon para evaluar los efectos crónicos. Una vez que el primer individuo alcanzó la metamorfosis (STD 46), se realizaron las mediciones de todas las variables de respuesta y se dio por finalizado el experimento.

Experimento 2: El diseño experimental contó con 150 renacuajos distribuidos individual y aleatoriamente en cámaras de ensayo, conformando 5 grupos con 30 réplicas cada uno. Cada grupo identificado desde el comienzo de la experiencia fue mantenido en condiciones controladas de laboratorio hasta la aplicación de los tratamientos, los que consistieron en exposiciones continuas al tóxico a partir de cuatro momentos distintos del desarrollo: T1: estadio 9 (17 hs de edad); T2: estadio 25 (182 hs de edad); T3: estadio 37 (1190 hs de edad) y T4: estadio 41 (1526 hs de edad). El tóxico utilizado fue dicromato de potasio en solución acuosa, en una concentración constante de 9 mg Cr(VI)/L. Los datos se tomaron hasta el momento en que todos los tratamientos presentaban al menos un individuo metamorfoseado. Una vez alcanzado el estadio 42 los individuos fueron aislados en las cámaras de ensayo, hasta que llegaron al estadio 46, momento en el que se realizaron las mediciones de todas las variables de respuesta y se dio por finalizado el experimento.

Las variables de respuesta seleccionadas para ambos experimentos fueron el crecimiento, el desarrollo y la supervivencia. El crecimiento fue registrado una vez por semana midiendo la longitud del cuerpo (LCU) con un calibre de precisión cercana a 0,01 mm, en coincidencia con la determinación de la supervivencia (número de organismos vivos / número de organismos muertos por cámara de ensayo). Además, en el momento de la primera metamorfosis, se registró el peso de todos los renacuajos con una precisión cercana a 0,001 g empleando una balanza electrónica, en coincidencia con la observación mediante lupa estereoscópica para determinar el estadio de desarrollo.

2.1.d Criterios de aceptación de los experimentos

Para determinar el criterio de aceptación de los experimentos y confiabilidad de los resultados, primeramente se realizó una clasificación de cada ensayo con dos tipos de criterios que se detallan a continuación, para luego efectuar una planilla (Tabla 5) y evaluar finalmente la aceptación o el rechazo del mismo.

Criterios a priori:

Según la etapa de la investigación y consecuentemente las cuestiones metodológicas involucradas (número de réplicas, número de individuos por réplica, edades de las larvas, variaciones en las condiciones de exposición y precisiones en la determinación de los estadios), se clasificó a los ensayos en tres categorías: a) preliminar: ensayos sin réplicas y con amplios intervalos de concentración a evaluar, mayormente realizados en las primeras etapas de la investigación; b) definitivo: ensayos con un mínimo de tres réplicas y diseñados dentro del intervalo entre 0 y 100% de mortalidad, ejecutados posteriormente a los ensayos preliminares, que si bien no poseían todas las condiciones establecidas para los ensayos propuestos, permitieron obtener estimaciones confiables de las curvas Dosis-Respuesta y c) estandarizado: todo aquel ensayo posterior al número 15 que contó con la metodología propuesta final (Item 2.1.c₂).

Criterios a posteriori:

Los criterios *a posteriori* contemplaron varias categorías, todas analizadas una vez finalizados los experimentos y relacionadas con el procedimiento durante el transcurso del mismo y la precisión o confiabilidad de los resultados obtenidos.

1) Ante la posibilidad de que existieran dudas o accidentes en el procedimiento que se reflejaran claramente en los resultados, se clasificó a los ensayos como: a) descartado: cuando los accidentes impidieron el análisis de datos, o se descubrieron contaminaciones o factores externos (cortes de luz, agua, otros) que influyeron negativamente sobre los resultados; b) aceptable: cuando los errores de procedimiento fueron circunstanciales y su magnitud no influyó significativamente sobre los resultados y c) seguro: cuando no existieron accidentes o errores en el procedimiento.

2) Las muertes en los grupos control debieron ser menores al 10%, pudiendo variar según el *n* total ensayado. Se clasificaron como: a) aceptado: muertes menores al 10% en el grupo control, b) rechazado: muertes en el grupo control superiores al 10%.

3) Las concentraciones nominales de la solución del contaminante utilizado no debieron presentar diferencias significativas con las concentraciones efectivas obtenidas a partir de la verificación analítica. Se clasificaron como: a) aceptado: las concentraciones nominales no difirieron significativamente de las concentraciones efectivas y b) rechazado: las concentraciones nominales presentaron diferencias significativas respecto de las concentraciones efectivas.

4) Debió existir concordancia o “ajuste” con los supuestos de los modelos estadísticos utilizados⁵. Se clasificaron como: a) aceptado: concordancia total con los supuestos asumidos y b) rechazado: al menos una de las pruebas de significancia se rechaza.

5) Respecto a la representatividad del tamaño de muestra (***n***) con el que se realizaron las estimaciones de los distintos parámetros y posteriores inferencias estadísticas, se clasificaron como: a) aceptado: aquellos que posean valores altos de ***n*** > 3 y sus estimaciones sean buenas (considerando los coeficientes de correlación (***r***), su significancia (***p***) y los límites de confianza de las pendientes) y b) rechazado: aquellos casos con ***n*** menores a 3 y/o cuyos ***p*** sean menores a 0,05 o sus resultados se alejen de la tendencia general.

6) La variabilidad tan ampliamente mencionada en los resultados de cada bioensayo deberá ser menor a los valores aceptables: variaciones de entre el 10 y 20%, FV's entre 1,2 y 1,9 y CV's menores al 15%.

2.1.e Variaciones del diseño experimental en los bioensayos de toxicidad del agua

Las variaciones del diseño experimental fueron clasificadas en dos tipos:

a) Las variaciones del diseño experimental no planificadas: Fueron asociadas a la disponibilidad de embriones y larvas de cada puesta, al tipo de puesta, al estadio en el que se encontraban las larvas y al grado de conocimiento de la sensibilidad de la especie a ensayar. Consistieron fundamentalmente, en cambios en el número de concentraciones utilizadas en cada ensayo, variando entre 6 y 19 concentraciones y manteniéndose las demás condiciones mencionadas en el ítem anterior sin variaciones.

b) Las variaciones del diseño experimental planificadas: Fueron asociadas con la contrastación de las hipótesis de trabajo planteadas (Tabla 2) y se resumen en la Tabla 4 (página siguiente). En este ítem nos vemos obligados a mencionar por adelantado algunos aspectos de resultados obtenidos, que nos llevaron a reformular partes de la metodología y generaron las variaciones que se explican seguidamente. Las mismas se presentan en orden, producto de la reestructuración de la información.

Una vez procesada la totalidad de los resultados de los bioensayos, se efectuaron las clasificaciones de los mismos según los criterios de aceptación *a posteriori*. (Tabla 5, página subsiguiente). Esta clasificación determinó un reordenamiento de la información que generó algunas incompatibilidades a la hora de realizar

⁵ Las contrastaciones de estos supuestos, se realizaron mediante el programa EPA PROBIT, versión 1.5, mencionado anteriormente.

comparaciones estrictas entre curvas o grupos de curvas D-R y seguidamente contrastar algunas de las hipótesis planteadas (Tabla 2). Por otro lado, de la interpretación de los resultados, surgieron obligadamente como parte de la investigación, nuevas hipótesis que merecieron tratarse realizando ajustes en los procedimientos propuestos.

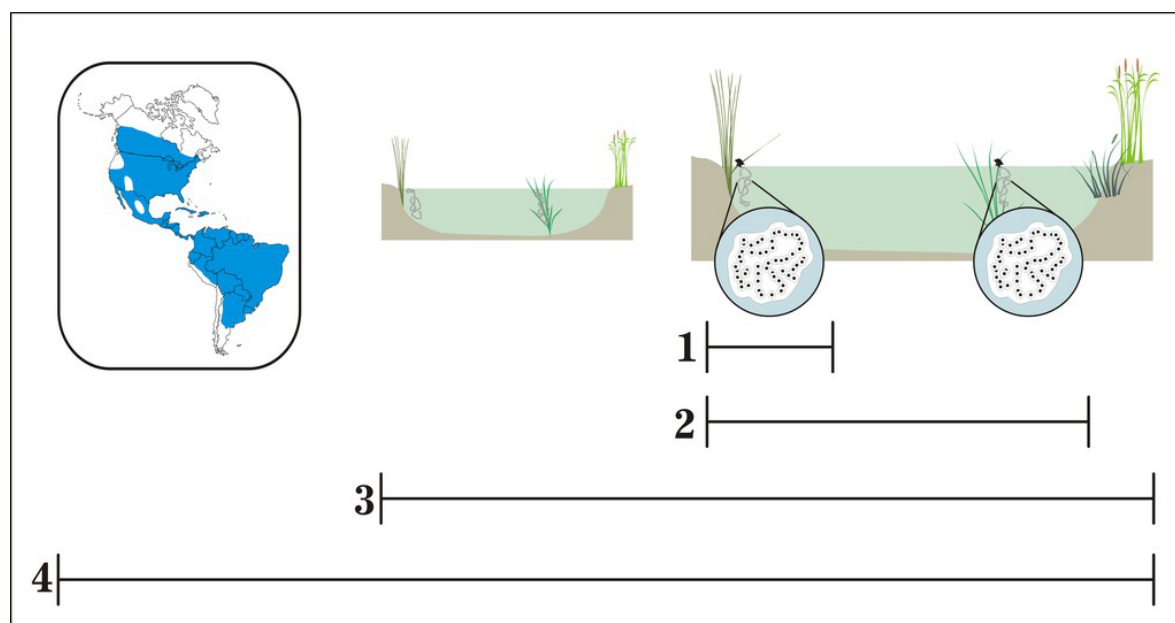
Tabla 4 Diseños experimentales planificados

Ens Nº	Hipótesis involucrada	Diseño	Estadio	Edad (hs)	Etapas	Particularidad	Estacio- nalidad	Población
1		NORMAL	22-25	85	I		1	MOL
2		NORMAL	22-25	109	I		1	MOL
3		NORMAL	22-25	168	I		1	MOL
4		NORMAL	25	144	I		1	MOL
5	Desarrollo (comp. con ens. 4)	PARTICULAR	30	1320	V	Ensayado a las 1320 h de edad	1	MOL
6		NORMAL	25	120	I		2	FRI
7		NORMAL	25	120	I		2	FRI
10	Desarrollo (comp. con ens. 12)	PARTICULAR	8-10	24	I	Ensayado en estado embrionario	2	MOL
12		NORMAL	25	140	I		2	MOL
13		NORMAL	25	120	I		1	ATA
14		NORMAL	25	264	I		2	MOL
15		NORMAL	25	240	I		2	ARR
21		NORMAL	25	152	I		1	ARR
22	Estático (comp. con ens. 21)	PARTICULAR	25	158	I	Ensayado con modo estático	1	ARR
23		NORMAL	25	158	I		1	PIL
24	Desarrollo (comp. con ens. 22)	PARTICULAR	27	279	II	Ensayado a las 279 h de edad	1	ARR
25		PARTICULAR	26	277	II	Ensayado a las 277 h de edad	1	ARR
26	Desarrollo (comp. con ens. 23)	PARTICULAR	25	257	II	Ensayado a las 257 h de edad	1	PIL
27	Desarrollo (comp. con ens. 25y21)	PARTICULAR	28	800	III	Ensayado a las 800 h de edad	1	ARR
28	Desarrollo (comp. con ens. 29)	PARTICULAR	8-10	16	I	Ensayado en estado embrionario	1	BRY
29		NORMAL	25	152	I		1	BRY
34		PARTICULAR	25	588	III	Ensayado a las 588 h de edad	1	MOL
43	FETAX (comp. con ens. 44)	PARTICULAR	25	159	I	Ensayado en modo FETAX	1	MOL
44		NORMAL	25	159	I		1	MOL
45		NORMAL	25	159	I		1	FRI
46		NORMAL	25	159	I		1	FRI
47	Dureza (comp. con ens. 46)	PARTICULAR	25	159	I	Ensayado con agua diluida	1	FRI
48	Desarrollo (comp. con ens. 45)	PARTICULAR	27	619	I	Ensayado a las 619 h de edad	1	FRI

En primer lugar se contrastó la hipótesis que consideraba la **Variabilidad Total** (en adelante VT) (incluye **H4a**) entre los ensayos realizados con la metodología propuesta y se asumió que esta VT está compuesta por variabilidades que se pueden atribuir a diferentes factores mediante la siguiente forma: **VT = Vp + Vch + Va +....+ Vn + Ve**, donde **Vp** representa la variabilidad de la puesta, **Vch** la variabilidad de la charca, **Va** la variabilidad anual o estacional, considerando a **Vn** como toda aquella variabilidad explicada por factores intrínsecos del ecosistema, ya sean bióticos o abióticos, y a **Ve** como la variabilidad del error o variabilidad no explicada (ver Ítem 1.5 para más detalles). Ante esta situación se realizó una interpretación sobre la forma en que estaban relacionadas las distintas fuentes de variabilidad evaluadas dentro del sistema de estudio y se definieron unidades de variación (en adelante UV).

En la Figura 6 se muestra la interpretación de las distintas fuentes de variabilidad aportadas principalmente por el origen de las puestas dentro y entre los ensayos planteados en el sistema de estudio. Consecuentemente se asumen *principios de mínima de variación*: el primero de ellos es que la unidad mínima de variación la tendrán aquellos bioensayos realizados con renacuajos obtenidos a partir de una misma puesta **(1)**, el segundo plantea que la realización simultánea de bioensayos es otra UV mínima y el tercer principio considera bioensayos realizados con puestas recogidas de una misma charca **(2)** o en una misma noche (esta UV incluiría la variabilidad entre puestas y/o entre charcas). De aquí se deduce que las *comparaciones válidas e ideales*, entre dos condiciones experimentales, serían las realizadas a partir de una misma puesta, en comparaciones de bioensayos simultáneos.

Figura 6 Diagrama de las fuentes de variación



Los números indican: (1) variación intrapuesta (dentro de una mínima puesta); (2) variación interpuesta (entre puestas); (3) variación explicada por cada sitio reproductivo o charca (pueden o no ser distintas poblaciones); (4) variación de la población mundial (abarca la distribución de la especie en el planeta).

Tabla 5 Resultados y criterios de aceptación

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN																		
<i>a priori</i>										<i>a posteriori</i>							CONCLUSIÓN	
Ens N	Clasificación	Réplicas	Nºorg	Concentraciones			Intervalo evaluado			Respuesta			Variabilidad			AJUSTE	CRITERIO	FUNDAM.
				Ntot	Nefc	Nres	MIN	MAX	RANGO	LC50-96h	LCI	LCS	RANGO	F.V.	%			
1	PRELIMINAR 1	no		7	7	7	0,00	17,50	17,50	17,50			0,0		0	X	R	ajuste
2	PRELIMINAR 2	no		7	7	7	0,00	17,50	17,50	3,50			0,0		0	X	R	ajuste
3	PRELIMINAR 3	no		5	5	5	17,50	87,50	70,00	87,50			0,0		0	X	R	ajuste
4	PRELIMINAR 4	no		9	9	8	3,50	7,50	4,00	9,10	6,750	11,460	4,7	1,7	26	X*	R	V
5	DEFINITIVO 1	3	15	8	4		1,75	87,50	85,75	62,90	55,880	69,980	14,10	1,3	11	X*	R	precisión (n<3)/ajuste
6	PRELIMINAR 5	3	21	9	4	3	3,50	17,50	14,00	23,90	19,060	3.980,000	3.960,90	208,8	8.280	X*	R	variabilidad/ ajuste
7	PRELIMINAR 6	3	21	9	9	3	3,50	17,50	14,00	15,40			0,0		0	X	R	ajuste
10	DEFINITIVO 2	3	15	8	8	8	1,75	26,25	24,50	>22,50			0,0			X	R	fuera de rango
12	DEFINITIVO 3	3	21	8	6	5	1,75	26,25	24,50	19,40	16,614	23,096	6,5	1,4	17	V	A	V
13	DEFINITIVO 4	3	30	8	5	4	10,50	59,50	49,00	9,30	5,635	12,202	6,6	2,2	35	V	R**	variabilidad
14	DEFINITIVO 5	3	15	9	8	7	3,00	30,00	27,00	24,10	20,477	30,891	10,4	1,5	22	X*	R	V
15	ESTANDAR 1	4	20	8	4		3,00	45,00	42,00	13,60	12,008	13,105	1,1	1,1	4	V	R	precisión (n<3)
21	ESTANDAR 2	4	20	10	10	10	9,00	36,00	27,00	14,80	12,539	16,757	4,2	1,3	14	V	A	V
22	ESTANDAR 3	4	20	10	5	4	9,00	36,00	27,00	9,70	7,391	11,422	4,0	1,5	21	V	A	V
23	ESTANDAR 4	4	20	10	12	9	9,00	36,00	27,00	11,60	8,654	14,254	5,6	1,6	24	V	A	V
24	ESTANDAR 5	4	20	10	10	10	9,00	36,00	27,00	<9,00			0,0			X	R	fuera de rango
25	ESTANDAR 6	4	20	10	10	10	9,00	36,00	27,00	<9,00			0,0			X	R	fuera de rango
26	ESTANDAR 7	4	20	10	6	6	9,00	36,00	27,00	6,00	1,597	9,219	7,6	5,8	63	X*	R	variabilidad
27	ESTANDAR 8	4	20	14	9	9	0,50	36,00	35,50	7,30	4,852	9,282	4,4	1,9	31	V	A	V
28	ESTANDAR 9	4	20	15	15	15	1,00	90,00	89,00	>60,00			0,0			X	R	fuera de rango
29	ESTANDAR 10	4	20	15	13	10	1,00	90,00	89,00	29,60	27,458	31,942	4,5	1,2	8	V	A	V
34	ESTANDAR 11	4	20	7	5	4	3,00	60,00	57,00	<9,00						X	R	fuera de rango
43	ESTANDAR 12	4	20	15	13	12	0,50	60,00	59,50	16,50	14,307	18,268	4,0	1,3	12	V	A	V
44	ESTANDAR 13	4	20	15	11	6	0,50	60,00	59,50	14,20	12,945	15,333	2,4	1,2	8	V	A	V
45	ESTANDAR 14	4	20	13	13	11	3,00	60,00	57,00	15,50	13,485	17,527	4,0	1,3	13	V	A	V
46	ESTANDAR 15	4	20	13	12	7	3,00	60,00	57,00	15,10	13,149	17,009	3,9	1,3	13	V	A	V
47	ESTANDAR 16	4	20	13	13	8	3,00	60,00	57,00	6,00	4,181	7,073	2,9	1,7	24	V	A	V
48	ESTANDAR 17	4	20	12	11	7	0,10	60,00	59,90	4,20	2,255	6,249	4,0	2,8	48	V	R**	variabilidad

X* Significa que la correlación no fue significativa $p < 0,05$

R** Significa que fueron rechazados por la variabilidad pero las correlaciones fueron significativas, por lo que se consideraron aceptables

En segundo lugar, a partir de los resultados obtenidos de la contrastación de la hipótesis de VT y de la definición de las UV, surgió la necesidad de corroborar la existencia de variabilidad entre las charcas de las que se extrajeron huevos (18 categorías originales), agrupando éstas según un nuevo criterio o categoría denominado población (ver Tabla 3). Este nuevo criterio (población), surge de la interpretación del desplazamiento de las poblaciones estudiadas y de las distancias entre los sitios reproductivos, considerando también la fragmentación de hábitat existente entre las distintas zonas, a partir de los estudios realizados en campo (ver Capítulo III). De esta manera se determinaron seis poblaciones:

1) **MOL**: se denominó así a la población que habitaba el área de estudio Establecimiento Santa Ana, que utilizaba como sitios reproductivos a las charcas A y B; 2) **BRY**: se denominó así a la población que habitaba una charca ubicada en las afueras de Ignacio Correa, del otro lado del área de inundación del A° el Pescado (Charca Berny); 3) **FRI**: se denominó así a la población que habitaba una charca ubicada en la calle 7 y 652 (Charca Frison), en los alrededores del Barrio Parque Sicardi; 4) **PIL**: se denominó así a la población que se reproduce en la pileta de natación en una propiedad situada en el interior del barrio Parque Sicardi; 5) **ATA**: se denominó así a la población que habitaba el Balneario de Atalaya; 6) **ARR**: se denominó así a la población que habitaba en los alrededores de la Estancia La Merced, ubicada en el partido de Arrecifes (ver detalles en Tabla 3).

Para cada población se seleccionó una curva representativa, en los casos que existieron más de dos. Luego de verificar mediante los criterios establecidos su posibilidad de comparación, se procedió a realizar una prueba de significancia entre las mismas; si la prueba no mostraba diferencias significativas entre ambas curvas, fueron consideradas como réplicas y se procedió a fusionar los grupos de datos recalculando una curva (D-R) con la totalidad de los datos (ver análisis de datos para mayor detalle). Estos resultados dieron origen a nuevas curvas D-R, a las que se les asignaron nuevas denominaciones (ver Tabla 2 y Tabla 11).

Esta hipótesis denominada **Hipótesis Poblacional** (incluye **H4b**), merece comentar algunas consideraciones. Podría haberse denominado Hipótesis Geográfica, ó de Ambiente, ó Charca, ó Genética. Las poblaciones consideradas están en lugares lo suficientemente aislados como para constituir diferentes poblaciones. Cada población de una especie posee la variabilidad producto del acervo génico, además de la variabilidad que aportan las diferentes charcas (como limnobios) utilizadas como sitios reproductivos, dentro del área donde se distribuye esta población.

Si consideramos la población de la especie en su totalidad, existe un factor geográfico que aporta variabilidad más un factor relacionado con los acervos génicos de las distintas poblaciones de esta especie (Figura 6).

Al evaluar la hipótesis poblacional, estaríamos evaluando sin poder distinguir una de otra, las hipótesis de ambiente o charca y la hipótesis genética asociada (ambas indistinguibles entre ellas), además de un segundo par de hipótesis: la

geográfica (las charcas elegidas están en distintas regiones geográficas) y la genética asociada. Estaríamos entonces, para el caso de la hipótesis poblacional, distinguiendo entre poblaciones distintas, aisladas, pertenecientes a una misma especie, que habitan en regiones diferentes en ambientes y charcas diferentes.

Siguiendo este procedimiento se identificaron y evaluaron dentro de cada población, otras fuentes de variabilidad explicada, en relación con factores bióticos o relacionados con la ecología de la especie.

La **Hipótesis del Desarrollo** incluye en principio a **H4d, Pr4d, H4e y H4f**. Esta hipótesis fue planteada al inicio de la investigación, contrastándose en ocho oportunidades (ver Tabla 2). El procedimiento para realizar estos ensayos, consistió una vez obtenida la puesta, en colocarla en condiciones controladas de laboratorio, cuando los individuos de la puesta llegaron al estadio establecido, entre 8-10 (en el caso de los embriones) y 25 (en el caso de las larvas), fueron divididos en dos grupos. Uno de los grupos se utilizó para realizar un bioensayo agudo estandarizado. El otro grupo fue mantenido en laboratorio hasta que los organismos alcanzaron el estadio de desarrollo establecido según el objetivo de la comparación. Una vez en ese estadio, se procedió a realizar el mismo diseño experimental efectuado con el primer grupo.

Los resultados arrojados por los estudios bioecológicos realizados en laboratorio (ver Capítulo III), permitieron conocer la relación existente entre las curvas de crecimiento y desarrollo además de las relaciones entre las distintas variables utilizadas para evaluar el crecimiento. En las Figuras 7.a, b y c se muestra las relaciones encontradas entre las diferentes variables medidas: el crecimiento expresado como longitud, considerando la longitud total de las larvas (LT) y la longitud del cuerpo (LCU) a (0,01 mm); el peso de cada renacuajo a (0,001 g) y el estadio de desarrollo (STD), según Gosner, (1960).

Como era de esperar, todas las figuras muestran una clara relación entre estas variables, ya que el desarrollo está definido como el cambio de forma o estadios en función del tiempo, lo que implica una relación directa entre la edad de un individuo y el estadio de desarrollo alcanzado, Figura 7.a (Curvas de desarrollo), página siguiente. Por otra parte, el crecimiento se define como el aumento de tamaño del cuerpo (ya sea en longitud o peso) en función del tiempo, Figura 7.b de la página siguiente (Curvas de crecimiento), lo que también implica una relación directa entre la edad de un individuo y su tamaño. En la Figura 7.c de la página subsiguiente, se muestra la relación existente entre el desarrollo y el crecimiento. Estas relaciones, como se mencionó en el Capítulo I (Ítem 1.1.h), fueron objeto de estudio durante la década del '80 a partir de la discusión de un conjunto de hipótesis generadas en los trabajos de Wilbur y Collins (1973), Wilbur (1980), Travis (1984) y Seale (1987).

Figura 7.a Curvas de crecimiento

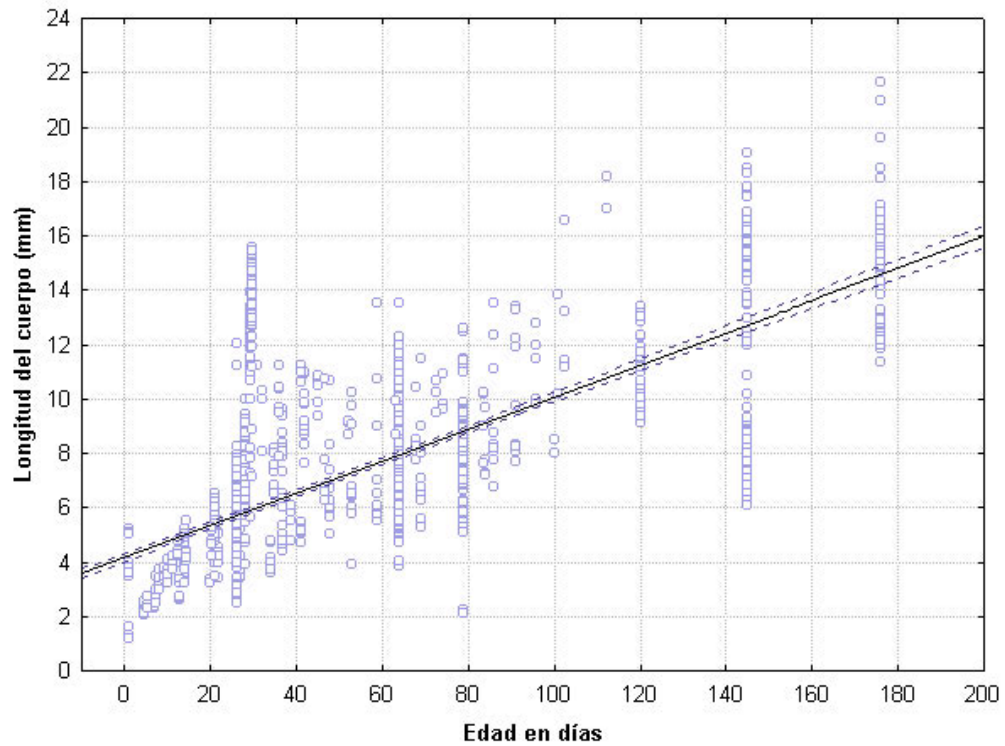


Figura 7.b Curvas de desarrollo

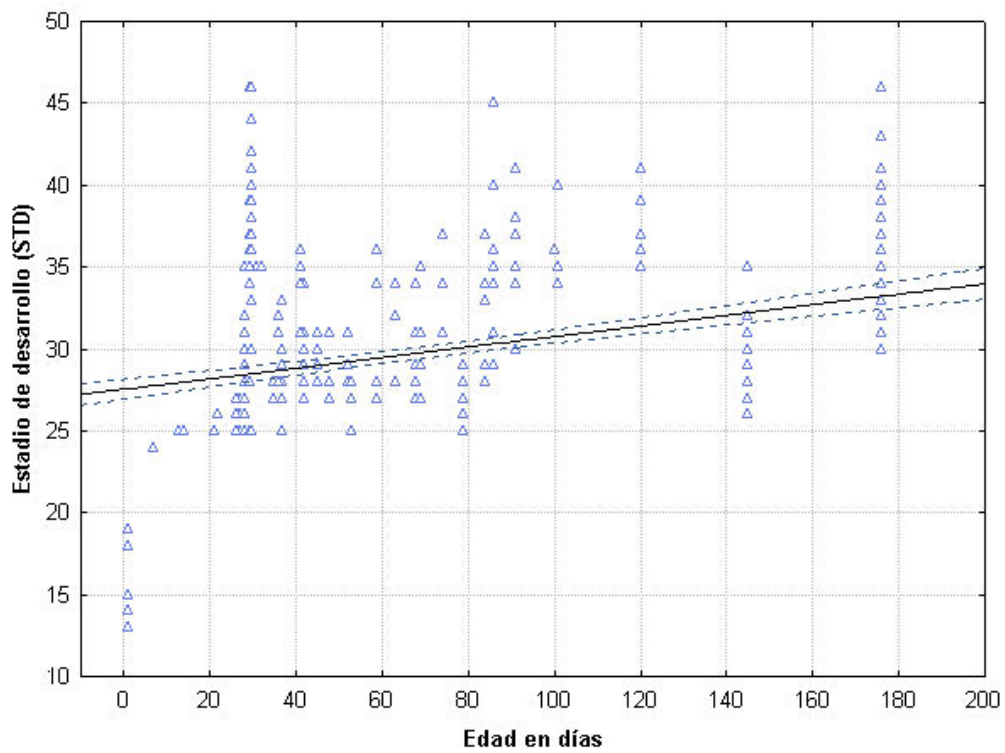
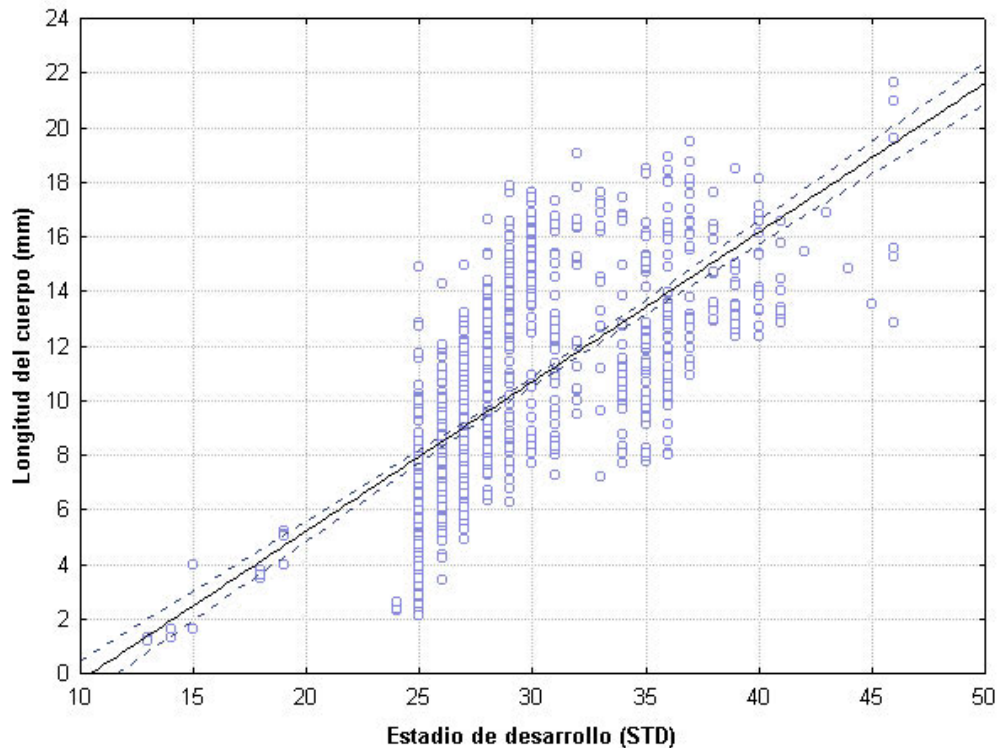


Figura 7.c Relación entre el crecimiento y el desarrollo



Si bien estas consideraciones no son novedosas, resultan de gran importancia a la hora de diseñar experimentos que intenten contrastar hipótesis toxicológicas respecto al tamaño, la edad y el desarrollo, como lo son las hipótesis antes aquí planteadas: **Hipótesis del Desarrollo** (incluye a **H4d** y **Pr4d**) e intenta distinguir diferencias entre los estadios de desarrollo; **Hipótesis de la Edad** (incluye **H4e**) y finalmente **Hipótesis del Tamaño** (incluye **H4f**). Esta última es de gran interés en el ámbito de la toxicología; incluso se encuentra modelizada como mencionamos anteriormente. Al examinar este último párrafo se deduce que la hipótesis del desarrollo, resulta para la metodología propuesta en el presente trabajo de tesis, indistinguible respecto a las hipótesis de edad y tamaño de las larvas. Las interpretaciones y conclusiones a las que se llegue por medio de la contratación de estos diseños experimentales, se tendrán que hacer referidas a la hipótesis conjunta **Desarrollo, Edad, Tamaño** (en adelante **Hipótesis DET**).

La **Hipótesis Estacional**, que incluye a **H4c** y a **Pr4c1**, asume que los huevos de *H. pulchellus* colectados en un mismo sitio en diferentes épocas del año no poseen la misma sensibilidad. Este concepto estaría asociado no directamente con las condiciones climáticas de la charca en la que se reproducen (ya que esta fuente de variación sería eliminada en condiciones de laboratorio), sino con el concepto de especie ecológica, por el cual una parte de la población, ecológicamente diferente, ocupa nichos separados (McDiarmid, 1999). En el caso de *H. pulchellus*, podría estar asociado a un proceso de preferencia o experiencia, ya que en relación con la madurez sexual, se generan agrupamientos reproductivos

de dos tipos - machos jóvenes inexpertos y machos maduros - que se reproducen en distintas épocas del año, o dicho de otra forma, utilizan diferentes nichos temporales. Siguiendo con este razonamiento, las hembras también se comportarían de esta manera; las que se reproducen en primavera no serían las mismas que las de verano. Por el contrario, si asumimos que no existe este agrupamiento, podríamos afirmar que las condiciones fisiológicas de las hembras en una y otra época del año - además de estar determinadas por su historia reciente -, serían distintas.

Esta hipótesis estacional considera a los meses y a las estaciones como factores agrupadores (incluye a **H4c** y a **Pr4c1**), y considera como una alternativa detallada a la estacionalidad (larvas invernales y primaverales). Debido a que estas nuevas variables o factores son abstracciones (agrupamientos de características o clasificaciones), la contrastación de estas hipótesis no requirió de ningún diseño experimental particular. Sólo se necesitó seleccionar de la base de datos, dos bioensayos estandarizados comparables, aceptados por los criterios antes expuestos y realizar la comparación de sus curvas D-R mediante la metodología estadística propuesta (ver más adelante).

Las hipótesis de procedimiento relacionadas con factores abióticos no presentaron inconvenientes en cuanto a los planteos teóricos, ya que son comparaciones simples de diferentes condiciones experimentales. Todas las contrastaciones tuvieron en común el desarrollo de un ensayo estandarizado como punto de comparación, y luego la realización simultánea de otro ensayo con pequeñas variaciones que se detallan a continuación.

La **Hipótesis de Dureza del agua** incluye a **H4h**. Para contrastar esta hipótesis, una vez obtenida la puesta, fue colocada en condiciones controladas de laboratorio. Cuando las larvas llegaron al estadio 25 fueron divididas en dos grupos, uno de ellos se utilizó para realizar un bioensayo agudo estandarizado (E-46) y el segundo grupo se utilizó para realizar el mismo procedimiento experimental, con la diferencia que al agua de ensayo se la diluyó a la mitad con agua destilada, previamente aclimatada (E-47). Ambos ensayos se realizaron simultáneamente en las mismas condiciones, cumpliendo de esta manera los principios de mínima variación, propuestos anteriormente (ver Tabla 2).

La **Hipótesis de Estaticidad**, que incluye **H4j**, se realizó con puestas de una misma localidad (Arrecifes), extraídas simultáneamente de dos charcas diferentes. Las puestas una vez colectadas en campo, fueron trasladadas al laboratorio para su aclimatación en condiciones controladas. Cuando las larvas de ambas puestas llegaron al estadio 25, con una de ellas se realizó un bioensayo agudo estandarizado (E-21), semiestático. Con la segunda puesta se realizó el mismo procedimiento experimental, aunque sin recambio del medio de ensayo (ensayo estático) (E-22). Cada 24 h, coincidiendo con el recambio y lectura del ensayo (E-21), todos los recipientes (E22) fueron revisados (lectura), extrayéndose los individuos muertos, finalmente tapándolos y reordenándolos aleatoriamente, siguiendo el procedimiento propuesto para los ensayos estandarizados. En este experimento

sólo se cumplió el principio de simultaneidad de extracción de puestas y de realización de ensayos, dado que las puestas si bien pertenecieron a una misma zona dentro de una misma localidad, se obtuvieron a partir de dos charcas diferentes (ver Tabla 2).

La **Hipótesis Comparativa de Procedimiento FETAX** incluye las hipótesis **H4h** agua de ensayo y **H4i** organismo. Con el objeto de contrastar estas hipótesis se realizaron dos ensayos diferentes cumpliendo todos los principios de mínima variación, propuestos anteriormente.

Para contrastar la hipótesis del agua de ensayo se utilizó una puesta extraída del área de estudio. Una vez obtenida, la misma fue colocada en condiciones controladas de laboratorio. Cuando las larvas llegaron al estadio 25 fueron divididas en dos grupos, uno de ellos se utilizó para realizar un bioensayo agudo estandarizado (E-44) y el otro grupo se utilizó para realizar el mismo procedimiento experimental, con la diferencia de que el agua utilizada en la prueba fue agua reconstituida, preparada según el procedimiento propuesto por FETAX (ASTM, 1991 ID116; Bantle *et al.*, 1996 ID25 (E-43)). Ambos ensayos se realizaron simultáneamente en las mismas condiciones, cumpliendo de esta manera los principios de mínima variación, propuestos anteriormente (ver Tabla 2).

La otra comparación de procedimiento, es la que compara mediante dos bioensayos estandarizados la sensibilidad de la especie estudiada en el presente capítulo, *H. pulchellus*, con la sensibilidad de la especie propuesta por el protocolo FETAX, *X. laevis*. Con este propósito se realizó un ensayo estandarizado utilizando renacuajos de *X. laevis* en estadio 25, obtenidos a partir de una pareja de *X. laevis* mantenida en condiciones de laboratorio e inducida según el procedimiento FETAX. Al ser una especie exótica y criada en cautiverio, no fueron respetados los principios de mínima variabilidad referidos al origen. Tampoco se respetaron los principios de simultaneidad, debido a la dificultad de hacer colocar huevos al mismo tiempo en la naturaleza y en el laboratorio a dos especies tan distintas. Sin embargo se mantuvieron constantes las condiciones de ensayo estandarizado para poder realizar comparaciones con cualquier otro bioensayo estandarizado realizado con *H. pulchellus* (ver Tabla 2).

2.2 Análisis de datos

La totalidad de los datos obtenidos fue organizada en una planilla de 22 columnas por 2934 filas, denominada Planilla Básica de Datos (utilizada para realizar el análisis de datos de los Capítulos 4 y 5). La misma fue explorada y analizada mediante las distintas técnicas estadísticas propuestas y sus resultados fueron agrupados en nuevas hojas de cálculo según el análisis realizado: regresiones, cálculos de LC(10-90) para 24, 48, 72 y 96 h, comparaciones de curvas D-R, entre otras. De la totalidad de la información obtenida se seleccionaron, para realizar los análisis correspondientes al presente capítulo, aquellas filas que contenían la información

sobre las exposiciones agudas a 96 h en los 28 ensayos realizados con *H. pulchellus*, lo que representó un 10,77% de la información producida.

El análisis de datos realizado requiere ciertas profundizaciones matemáticas y estadísticas relacionadas con la fundamentación de la elección de las técnicas utilizadas, que son base para la discusión de los resultados obtenidos del presente y próximo capítulo, además de la discusión final del Trabajo de Tesis.

Con motivo de facilitar la lectura y la comprensión del texto, se presenta a continuación un resumen de los análisis realizados y posteriormente se abordan en detalle cada uno de ellos en particular.

2.2.a Resumen

Los puntos finales evaluados, desde el enfoque toxicológico, fueron en el caso de los ensayos agudos la mortalidad a las 24, 48, 72 y 96 h, y en el caso de los ensayos crónicos la supervivencia, la inhibición del crecimiento y del desarrollo. El análisis realizado para cada grupo de resultados obtenidos a partir de cada bioensayo, consistió en la aplicación - por medio de planillas de Excel - del análisis Probit propuesto por (Finney, 1971), con el objetivo de estimar las curvas D-R, de cada especie respecto al Cr(VI) y calcular las LC50 y sus límites de confianza al 95%, los niveles de insipiente, además de los NOEC y los LOEC. Posteriormente los mismos grupos de datos fueron corridos en el *Probit Analysis Program*, versión 1.5. Los resultados arrojados por este *software*, además de permitir la comparación con resultados obtenidos en otras investigaciones, fueron un punto válido de comparación para verificar los resultados obtenidos anteriormente y por otra parte para corroborar los supuestos de los métodos estadísticos utilizados como ser: ajuste de los datos al modelo Probit (contrastado mediante una prueba de bondad de ajuste con el estadístico CHI-cuadrado), y los supuestos del análisis de regresión lineal simple (prueba de significancia para la pendiente).

Para el mejor aprovechamiento de los datos se realizaron análisis estadísticos simples (estadística descriptiva), comparaciones simples y múltiples (diversas pruebas de hipótesis), ANOVA, ANCOVA y MANOVA, además de análisis de Regresión y Correlación (los mismos se detallan a medida que son mencionados). La significancia entre curvas D-R, se resolvió mediante pruebas de comparación de pendientes y ordenadas al origen en los casos en los que se compararon sensibilidades de diferentes especies, estadios, tiempos de exposición, edades de exposición, orígenes geográficos, estacionalidad y otras fuentes de variación analizadas.

Por último se realizó una estimación general de la sensibilidad de *H. pulchellus* al Cr(VI) en ensayos agudos, se calculó su nivel de insipiente, sus LOEC y NOEC, además de los análisis que influyen en la duración de la exposición (Mayer *et al.*, 1996). Se contrastaron las estimaciones realizadas con los resultados obtenidos a partir de las exposiciones crónicas.

2.2.b Consideraciones sobre el tratamiento de los datos y análisis estadístico

2.2.b₁ Introducción

A la hora de evaluar los efectos tóxicos de un contaminante sobre un organismo, los enfoques clásicos de la toxicología intentan describir la relación entre la concentración de un compuesto químico y el consecuente efecto nocivo que le produce. Esta relación, conocida como *relación dosis-respuesta*, constituye la base para el entendimiento de los efectos generados por las sustancias químicas sobre los organismos de prueba, además de ser considerado como el *paradigma* básico de la toxicología acuática (Rand, Wells y McCarty, 1995) [Capítulo I del Rand, 1995].

Esta relación se intenta aproximar mediante experimentos sencillos a los que se los conoce con diferentes nombres: *pruebas de toxicidad*: se denomina de esta manera a todo experimento en el que se evalúan las concentraciones de un químico y el tiempo de exposición requeridos para generar un efecto. Las *pruebas de toxicidad acuáticas* son usadas para detectar y evaluar el potencial efecto toxicológico de químicos en organismos acuáticos. (generalmente a esto se le llama *bioensayo*⁶). Finney (1978) realiza una serie de definiciones, asociadas a la toxicología: *Ensayo biológico* o *bioensayo*: experimento para estimar la naturaleza, constitución o potencia de un material (o de un proceso), por medio de una reacción que se aplica a la materia viviente. Distinguió entre bioensayos directos⁷: cuando se compara la toxicidad o potencia de una solución preparada a partir de una mezcla desconocida con la potencia de una solución estándar (conocida) y los bioensayos indirectos: al método más familiar en el que se preparan múltiples concentraciones con muchos sujetos y múltiples dosis (o tiempos de exposición). Dentro de esta categoría estarían incluidos los bioensayos agudos (cortos) que consideran la mortalidad (variable cuantitativa discreta “*quantal*”) o *indirect quantal bioessays* y los bioensayos crónicos (largos) que consideran efectos no letales (variables cuantitativas continuas) o *indirect quantitative bioessays*.

Las pruebas de toxicidad acuáticas o bioensayos indirectos (en adelante bioensayos) realizados en el presente trabajo de tesis, involucran un agente o estímulo (Cr(VI)), el cual se aplica a un grupo de organismos (renacuajos), que constituyen una muestra de la población estudiada, de la cual queremos inferir su sensibilidad relativa.

⁶ Existe una definición farmacéutica de *bioensayo* como: una prueba para evaluar la potencia relativa de un químico cuando comparamos su efecto sobre organismos vivos con una preparación estándar. Contrariamente, una *prueba de toxicidad acuática* es diseñada para medir el grado de respuesta producida por un nivel específico de un estímulo (una concentración de un tóxico o químico).

⁷ Según Finney (1978), en esta categoría también entrarían los *ensayos de bioconcentración*, además de formar parte de una categoría particular (la contraparte de pruebas de toxicidad agudas y crónicas) en la que no se estudian efectos adversos, sino la cinética y comportamiento de los contaminantes.(Rand, 1995).

La magnitud del estímulo (en adelante dosis) fue medida como concentración, mg Cr(VI)/L de agua de ensayo, y considerada como un factor fijo, el cual puede ser preparado sin error. La respuesta escogida en este caso, la mortalidad de un individuo, es una respuesta todo o nada propuesta por Finney (1971), con el nombre de respuesta cuantitativa (*quantal response*). La variable de respuesta analizada en los bioensayos realizados fue el número de organismos muertos por concentración; es una variable discreta constituida por un conjunto de respuestas todo o nada, que posee una distribución de frecuencias particular, denominada *binomial distribution*.⁸

Uno de los supuestos asumidos en este análisis es que la magnitud de la respuesta dependerá de la dosis aplicada aumentando proporcionalmente desde 0 a 100 % a una tasa determinada, razón por la cual los bioensayos se realizaron utilizando distintas dosis dentro del intervalo (0-100%), el que fue determinado mediante la realización de ensayos preliminares, que se detallan en la Tabla 5. Debido a que como mencionamos anteriormente uno de los objetivos de los bioensayos es comparar, o estimar la potencia de un tóxico con relación a un grupo control, en todos los ensayos se utilizaron dos grupos control: uno como blanco y otro como control de procedimiento.

Es importante destacar, como mencionamos en la introducción, que la respuesta a una dosis en particular se verá afectada por los factores modificadores relacionados con las variaciones en el diseño experimental y además en mayor o menor medida por factores no controlados durante el experimento, como ser las diferencias en la resistencia dentro del grupo de organismos expuestos. Ello implica que la magnitud de la respuesta de la variable seleccionada responde de manera discreta e individualmente impredecible (ocurre o no ocurre) en relación con la magnitud del estímulo.

Para un sujeto (renacuajo) bajo condiciones controladas, debería existir un nivel de intensidad (una concentración de Cr(VI)) por debajo del cual la respuesta (mortalidad) no ocurre y sobre el cual la respuesta ocurre; este umbral es para el que Finney (1971), adopta el término tolerancia. Meister y Brink, (2000) retoman este concepto y lo explican como la capacidad de resistir concentraciones variables de un tóxico, considerando que cuando la concentración excede la resistencia individual el animal muere. Este concepto de tolerancia individual o dosis efectiva individual (en adelante **IED**) es sumamente importante, debido a que es el punto de partida en el que se basan los modelos propuestos para el análisis de curvas D-R (Newman Unger, 2003).

Si consideramos que en la definición del concepto **IED** está la explicación acerca de la forma de las curvas D-R, es inevitable plantear aquí las bases para la discusión que históricamente condicionaron la decisión de determinar qué función de distribución (si log-normal o log-logistic) describe mejor los datos y consecuen-

⁸ Si bien la fórmula de esta distribución fue descripta por Newton (1642-1727), fue David (1995) a quien se adscribe su denominación como "*binomial distribution*".

temente, qué modelo (Probit o Logit) explica mejor la curva D-R y permite realizar interpretaciones biológicas más realistas respecto a las respuestas obtenidas.

Newman y McCloskey (2000), proponen un par de hipótesis excluyentes que explican la forma de la curva D-R, según el modelo Probit. La **hipótesis IED**, plantea que los individuos poseen una cualidad innata llamada tolerancia individual y mueren cuando reciben una dosis igual o superior a ésta. Dichas tolerancias individuales se distribuyen de manera log-normal. Las variaciones entre los grupos deberían responder a los mecanismos que dominan sobre la tolerancia innata, y están influenciadas por variaciones del desarrollo, ambientales y genéticas. Esto implica una respuesta fija o determinada (no modificable) ante una exposición, proponiendo a la variabilidad de respuesta entre los individuos como una expresión fenotípica. Esta hipótesis plantea que a partir de una primer exposición, los individuos que sobreviven al experimento (poseen un **IED** mayor a la LC50), una vez recuperados y expuestos nuevamente al mismo experimento, no deberían sufrir mortalidades (justamente debido a que su cualidad individual los determina como tolerantes a esas condiciones).

Por el contrario la **hipótesis estocástica**, plantea que los procesos que ocurren dentro de un individuo y que hacen a su tolerancia son los mismos en todos los individuos. La probabilidad de morir de un individuo aumenta cuando se incrementa la dosis (esta distribución se explica mejor con la función log-logistic (Berkson, 1951)). Se plantea que todos los individuos poseen la misma tolerancia y el mismo espectro de respuestas y que esta tolerancia no es única (o sea que la tolerancia no es un concepto individual sino de un grupo de datos y de allí se derivará la tolerancia promedio individual) y la variabilidad en la respuesta está dada por una cuestión de probabilidades (modelo estocástico) en el desempeño de la respuesta. Que un individuo responda rápidamente (sea sensible) o responda lentamente (sea tolerante), es cuestión de azar (Newman y Unger, 2003). Esta hipótesis trae aparejado que dada una primera exposición en la que se estimó la LC50, en la segunda exposición, volverán a morir el 50% de los individuos (en una secuencia 100% → 50% → 25% → 12,5% → 6,25% → y así), en las sucesivas exposiciones respecto al número inicial de organismos expuestos. Resumiendo: Newman y McCloskey (2000) mencionan que la distinción entre las hipótesis es si la variación en la mortalidad **es** (hipótesis **IED**) **o no es** (hipótesis estocástica) una cualidad única de los individuos. Durante los últimos 60 años se utilizó la hipótesis **IED** debido a que su uso sobrevivió a rigurosas pruebas y permaneció como la única explicación de la respuesta en los principales libros de texto y publicaciones ecotoxicológicas, respecto al modelo Probit. Estos mismos autores, realizaron dos tipos de experimentos que contrastaban estas hipótesis y concluyeron que las pruebas obtenidas estaban en favor de la hipótesis estocástica; ello si aceptaban los supuestos impartidos al principio de la investigación (por ejemplo que no existía debilitamiento de los organismos expuestos de una exposición a la siguiente). Además, recomendaban que, si bien ninguna de las dos hipótesis estaba corroborada y se podía considerar como verdadera, a la hora de interpretar y realizar predicciones desde los resultados de los experimentos que utilizan el análisis Probit, basándose en la hipótesis **IED**, se debería ser cuidadoso, ya que si no se

contempla la hipótesis estocástica, se podría poner en riesgo de extinción a las poblaciones analizadas. Irían muriendo con el tiempo a diferencia de ser tolerantes por siempre. Si el concepto de **IED** es correcto los sobrevivientes de una exposición en el medio, serían los más tolerantes y el impacto sobre la población de supervivientes sería menor en subsecuentes exposiciones. Por el contrario, si la probabilidad de muerte es la misma en todos los individuos, los sobrevivientes, quienes no serían inherentemente más tolerantes, sufrirían un nuevo impacto más grave en una segunda exposición. Newman y Unger, (1977p) coinciden. Según Heagler *et al.* (1993), las diferencias innatas entre los individuos se manifestarían a bajas concentraciones, solapándose al exponerlas a concentraciones altas, donde predominarían los procesos estocásticos.

En las pruebas de toxicidad habitualmente practicadas, en las que se acepta por completo el concepto **IED** como una cualidad única de los individuos, se desconocen los valores de tolerancia individual y se intenta mediante un modelo matemático empírico, describir los resultados de tipo todo o nada, basándose en una nueva variable de respuesta definida por Bliss (1935) como unidad Probit (*probability unit*) y su distribución de probabilidades. Es así que utilizando el modelo Probit, se estiman los parámetros μ y σ de la distribución de tolerancias, mediante el método de máxima verosimilitud (*maximum-likelihood*) aplicado usualmente para el ajuste de este tipo de datos (Morgan, 1992).

Existen tres modelos predictivos propuestos para el análisis de las respuestas cuantales: el modelo Probit, el modelo Logit y el modelo Weibull. A pesar de las discusiones e implicancias teóricas a favor de uno y otro, largamente desarrolladas en la literatura durante los últimos 60 años, todos han sido ampliamente utilizados, obteniéndose buenos ajustes e interpretaciones de las curvas D-R (Newman y Unger, 2003).

Sin embargo, sin importar qué tipo de modelo se utilice para estimar la curva dosis-respuesta, una vez estimada se pueden utilizar métodos de regresión y correlación simples para interpretar y analizar dichas relaciones mediante técnicas estadísticas tradicionales. El objetivo final es estimar una serie de parámetros toxicológicos que sintetizan y permiten una rápida y sencilla comparación del poder tóxico de una sustancia o de la sensibilidad relativa de diferentes especies (como realizaremos en el Capítulo V), como también la comparación de diferentes condiciones de ensayo, para una misma especie expuesta a una misma sustancia (motivo del presente capítulo).

Entre los parámetros toxicológicos más utilizados que se calculan a partir de la relación D-R se encuentran: LC50: concentración letal media (*median lethal concentration*), se trata de una concentración que mata al 50% de los organismos expuestos; NOEC: es una concentración a la cual no se observan efectos (*no observed effect concentration*); LOEC: es una menor concentración a la cual se observan efectos (*lowest observed effect concentration*); y TL50: tiempo en el que sobreviven el 50% de los organismos expuestos (*median lethal time*).

En el presente estudio se asume a la LC50 como uno de los parámetros toxicológicos más representativos de la relación D-R y consecuentemente de la sensibilidad de una especie obtenida a partir de los bioensayos. Por otra parte, todos los bioensayos fueron diseñados para obtener la LC50 a las 96 h, por lo que se reafirma el sentido de la comparación entre las curvas D-R y su respectiva LC50 seleccionada para cada especie o para cada curva D-R procedente de los distintos agrupamientos realizados. La selección de este parámetro saldrá del análisis estadístico realizado sobre los distintos parámetros obtenidos para cada una de las especies (destacando la variabilidad y la precisión con que los mismos fueron estimados).

En general, los métodos de análisis de los resultados están bien documentados en la literatura (Finney, 1971; EPA, 1989; EC, 1999, ASTM, 1991; Newman y Unger, 2003, Rand, 1995, Sparks, 2000 y Ronco *et al.*, 2000b). En la actualidad se han desarrollado distintos *softwares* que analizan conjuntos de datos aplicando el análisis Probit según Finney, (1971), los que arrojan las estimaciones deseadas, además de algunos detalles sobre la contrastación de los supuestos estadísticos empleados en los modelos. Entre ellos se encuentra el *Probit Analysis Program*, versión 1.5, suministrado por la USEPA junto con sus protocolos de ensayos agudos y crónicos. El uso de este programa ha sido ampliamente aceptado y su aplicación es frecuente en las investigaciones ecotoxicológicas.

El *Probit Analysis Program* fue utilizado para procesar los resultados de los bioensayos realizados en el presente trabajo de tesis. Sin embargo, su empleo se justificó en primer lugar para la obtención de un punto válido de comparación con resultados obtenidos en otras investigaciones, para verificar los resultados obtenidos a través de los procedimientos propuestos y por último, como herramienta para corroborar los supuestos de los métodos utilizados.

La estadística juega un papel fundamental en la planificación, el diseño y la ejecución de los bioensayos de toxicidad, como así también el análisis e interpretación de los resultados obtenidos a partir de ellos. Si bien en el presente estudio se han empleado procedimientos estadísticos sencillos y tradicionales, éstos no son los acostumbrados para su aplicación en estudios ecotoxicológicos. Por ello consideramos necesario el desarrollo detallado de la metodología estadística empleada.

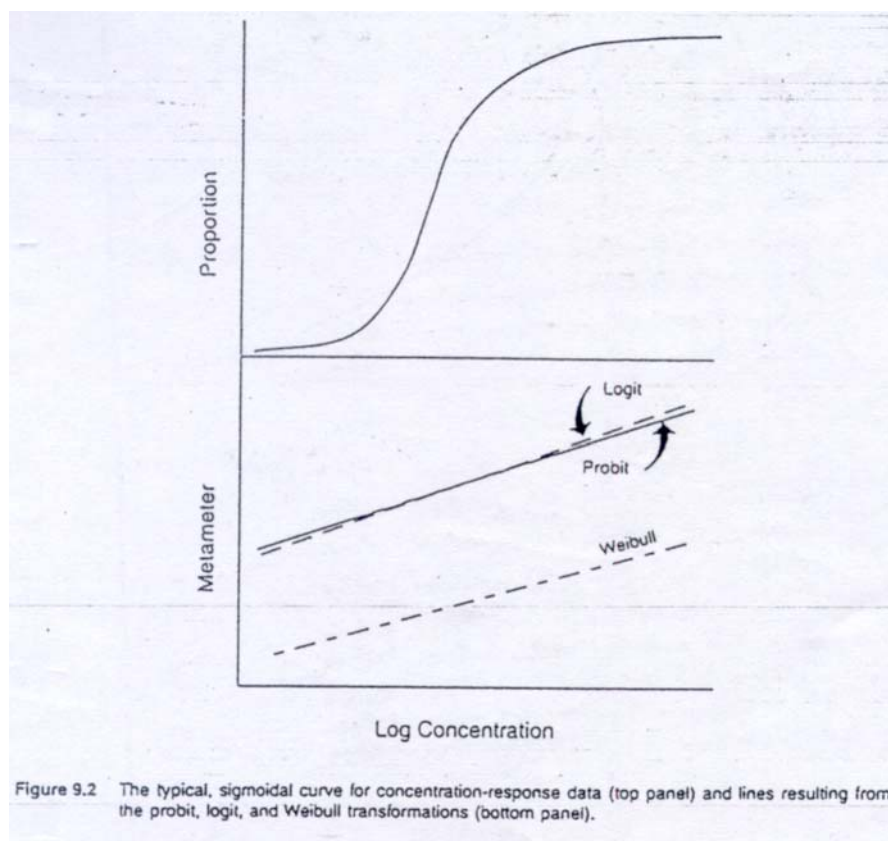
2.2.b₂ Metodología

Métodos estadísticos empleados

Como mencionamos en la introducción a la metodología, el objetivo principal de los bioensayos realizados es conocer la relación dosis-respuesta. Comúnmente, para analizar relaciones entre dos variables, se suelen utilizar análisis de regresión. Generalmente en biología y en distintas ramas de la ciencia, excluida la matemática, las relaciones entre dos variables suelen ser abordadas sólo por las técnicas de regresión lineal, debido a la simplicidad de aplicación y a la facilidad

de interpretación de la ecuación de la recta. Como se mencionó en la introducción, para el caso particular de las curvas D-R se han desarrollado diferentes modelos (Logit, Probit y Weibull) que logran buenos ajustes e interpretaciones de las curvas D-R (Newman y Unger, 2003). Los tres modelos realizan transformaciones de los datos denominadas *metameters*; todos los *metameters* propuestos por estos modelos generan una línea recta apropiada para el análisis de datos dosis-respuesta mediante regresión. Ver Figura 8 [Fig 9.2 Newman Unger], donde se observa que las líneas de los Logit y Probit son iguales excepto por sus extremos.

Figura 8 Curva sigmoidea normal típica (curva Dosis-Respuesta) y rectas resultantes de las transformaciones probit, logit y Weibull (Newman y Unger, 2003)



En el presente trabajo de tesis se adoptó el modelo de regresión lineal y sus diferentes aplicaciones, para interpretar la relación entre el estímulo y la respuesta evaluados, y las transformaciones Probit propuestas por Finney (1971).

Análisis de regresión: El análisis de regresión plantea la relación entre dos variables donde una es funcionalmente dependiente de la otra, siendo esta función en el caso de la regresión lineal la ecuación de la recta ($y = a + bx$). Además de asumir que la relación dosis-respuesta planteada es lineal y que el modelo elegido explicará ciertamente esta relación, debemos asumir los supuestos propios del

análisis de regresión: 1) Para cada valor de x existe una población con una distribución normal de valores de y (Normalidad). 2) Las varianzas de esas distribuciones normales de valores de y son iguales (Homogeneidad de Varianzas). 3) La relación de la población es lineal. 4) Los valores de y , provienen de un muestreo aleatorio de la población muestreada y son independientes unos de otros. 5) Las medidas de x fueron obtenidas sin error. La aplicación del análisis de regresión cumpliendo estos supuestos posee una gran robustez y confiabilidad, mientras que las violaciones a los diferentes supuestos no son aconsejables (Zar, 1999).

Gran parte de los procedimientos estadísticos empleados en el análisis de los bioensayos consisten en artimañas matemáticas para evitar la violación de los supuestos de la regresión. Zar (1999) menciona que la violación al quinto supuesto es típicamente imposible de afirmar en la práctica y que si estos errores pueden ser considerados despreciables o mínimos comparados con los errores de las poblaciones de y , no se incurriría en la violación a este supuesto. Por esa razón se decidió considerar a los errores en la preparación analítica de las concentraciones como despreciables. Ello está respaldado por los procedimientos de química analítica empleados y por la posibilidad que se tuvo *a posteriori* de medir las concentraciones efectivas.

Si graficamos el estímulo (Concentración de Cr(VI)) y la respuesta como porcentaje de renacuajos muertos en cada grupo expuesto en un diagrama de dispersión, en general obtenemos un patrón no rectilíneo de tipo sigmoide, donde las tasas de incremento en la respuesta por unidad de incremento en la dosis son frecuentemente bajas en las regiones de 0 y 100 % de respuesta, pero altas en la región media. Esta región media sería la región de interés para nuestro análisis, debido que si lográramos que fuera una recta homogénea, como la de la curva sigmoidea normal, podríamos aplicar nuestro modelo de regresión a la porción media de la curva.

Para transformar esta curva en una curva sigmoidea normal, transformamos las concentraciones en logaritmos decimales de las concentraciones (Transformación Logarítmica). Si bien de esta manera conseguimos una relación lineal entre nuestras dos variables, al seguir manteniendo como variable de respuesta a la proporción de individuos muertos por concentración, estaríamos violando el supuesto número uno y consecuentemente el dos del análisis de regresión. Finney dedicó parte de sus investigaciones a solucionar estas discrepancias a la hora de encarar estudios toxicológicos, y desarrolló una serie de técnicas que en conjunto se denominaron “*Probit analysis*”, publicadas en su mayoría en el libro “*Probit Analysis*” (Finney, 1971) y que como se mencionara anteriormente se adoptó en el presente trabajo de tesis.

Si a las proporciones de individuos muertos por cada concentración, las transformamos en lo que Gaddum propuso como desvío normal equivalente “*normal equivalent deviate*” (NED. en adelante) y a esta transformación le sumamos 5, obtenemos la transformación Probit propuesta por Finney. En nuestro caso aplica-

mos directamente a las proporciones de individuos muertos por concentración, la estandarización o normalización para proporciones de una distribución normal propuesta por Zar (1999) conocida como $z = (x-\mu)/\sigma$, desvío normal (“normal deviate”), donde el promedio de los valores es 0 y la varianza es igual a 1.

En la Figura 9 (página siguiente) se muestra una imagen de la pantalla de la PC con la planilla analizada con los datos en bruto, donde se muestran diferentes columnas: **SP**: código de la especie analizada, **N° de ens.:** número de identificación de los ensayos, **Fecha del ensayo**, **CONCENTR**: concentración mg Cr(VI)/L, **LOG (D)**: el logaritmo decimal de la concentración, **Respuestas** (número de individuos muertos en cada concentración), **n Total**: número total de individuos expuestos por concentración, **Proporci**: proporción de la respuesta, **%**: porcentaje de respuesta, y la columna siguiente “**Normaliz**” es justamente la columna en la que se aplica la función predeterminada en Excel como “**DISTR.NORM. ESTAND.INV.**”, la cual devuelve el inverso de la distribución normal estándar acumulativa, para una proporción asociada a una distribución normal. Estas serían los **NED**. o **Z**, descriptos anteriormente.

Al resultado de esta operación se le adicionó 5 y este resultado se muestra en la columna encabezada como “**Probit un**”, siendo efectivamente las unidades Probit, o dicho de otro modo, la transformación Probit de la proporción de individuos muertos para cada concentración.

Si graficamos las nuevas variables transformadas (logaritmo de la concentración y unidades Probit en un diagrama de dispersión), vemos como mencionamos al principio, que el efecto final de la transformación Probit, es la transformación de una curva normal sigmoidea en una línea recta. Este procedimiento permite sin inconvenientes aplicar ahora un análisis de regresión simple sin violación de los supuestos antes mencionados (Figura 10, página subsiguiente).

En adelante, siguiendo con el mismo procedimiento, se construyeron en este mismo programa (Excel) hojas de cálculo, en las que se diseñaban para estos mismos datos la resolución automática (con fórmulas incorporadas) de los siguientes análisis estadísticos⁹: cálculo de regresiones lineales simples, comparación de curvas de regresión, cálculos de límites de confianza de la regresión, y cálculo de predicción inversa para un valor predeterminado de $y = 5$ y sus límites de confianza (Figuras 11, 12 y 13, páginas subsiguientes).

⁹ Las fórmulas incorporadas a las planillas de Excel, fueron tomadas del libro (Bioestatistical Analysis, cuarta edición, Zar, 1999)

Figura 9 Tabla de datos brutos a analizar en Excel

Archivo Edición Ver Insertar Formato Herramientas Datos Ventana ?																
Cerrar pantalla completa																
DISTR.NORM.E... X ✓ = =DISTR.NORM.ESTAND.INV(H31)																
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
	SP	N° de Ens	Fecha de ens	CONCEA	LOG (D)	Respuet n	Total	Proporc %		Normali	Probit u	ARCOS	TIEMP	Edad	Semana	Estadio
29	1	31	18/11/03	27	1.4313638	1	20	0.05	5	-1.64	3.36	1.35	48	136	0	25
30	1	31	18/11/03	30	1.4771213	4	20	0.20	20	-0.84	4.16	1.11	48	136	0	25
31	1	31	18/11/03	33	1.5185139	4	20	0.20	20	IV(H31)	4.16	1.11	48	136	0	25
32	1	31	18/11/03	36	1.5563025	7	20	0.35	35	-0.39	4.61	0.94	48	136	0	25
33	1	31	18/11/03	60	1.7781513	16	20	0.80	80	0.84	5.84	0.46	48	136	0	25
34	1	DISTR.NORM.ESTAND.INV														
35	1	Probabilidad H31 = 0.2														
36	1	= -0.841621386														
37	1	Devuelve el inverso de la distribución normal estándar acumulativa. Tiene una media de cero y una desviación estándar de uno.														
38	1	Probabilidad es una probabilidad asociada a la distribución normal, un número entre 0 y 1 inclusive.														
39	1	Resultado de la fórmula = -0.84														
40	1	Aceptar Cancelar														
41	1	31	18/11/03	6	0.7781513	0	20	0.00	0	#¡NUM!	#¡NUM!	1.57	96	136	0	25
42	1	31	18/11/03	9	0.9542425	3	20	0.15	15	-1.04	3.96	1.17	96	136	0	25
43	1	31	18/11/03	12	1.0791812	3	20	0.15	15	-1.04	3.96	1.17	96	136	0	25
44	1	31	18/11/03	15	1.1760913	6	20	0.30	30	-0.52	4.48	0.99	96	136	0	25
45	1	31	18/11/03	18	1.2552725	9	20	0.45	45	-0.13	4.87	0.84	96	136	0	25
46	1	31	18/11/03	21	1.3222193	16	20	0.80	80	0.84	5.84	0.46	96	136	0	25
47	1	31	18/11/03	24	1.3802112	16	20	0.80	80	0.84	5.84	0.46	96	136	0	25
48	1	31	18/11/03	27	1.4313638	15	20	0.75	75	0.67	5.67	0.52	96	136	0	25
49	1	31	18/11/03	30	1.4771213	16	20	0.80	80	0.84	5.84	0.46	96	136	0	25
50	1	31	18/11/03	33	1.5185139	18	20	0.90	90	1.28	6.28	0.32	96	136	0	25
51	1	31	18/11/03	36	1.5563025	18	20	0.90	90	1.28	6.28	0.32	96	136	0	25
52	1	31	18/11/03	60	1.7781513	20	20	1.00	100	#¡NUM!	#¡NUM!	0.00	96	136	0	25
53	1	35	25/09/04	0	#¡NUM!	0	20	0.00	0	#¡NUM!	#¡NUM!	1.57	24	209	1	25
54	1	35	25/09/04	0	#¡NUM!	0	20	0.00	0	#¡NUM!	#¡NUM!	1.57	24	209	1	25
55	1	35	25/09/04	0.1	-1	0	20	0.00	0	#¡NUM!	#¡NUM!	1.57	24	209	1	25
56	1	35	25/09/04	0.25	-0.60206	0	20	0.00	0	#¡NUM!	#¡NUM!	1.57	24	209	1	25
57	1	Datos brutos Codificaciones SOLO BUFO														

Figura 10 Transformación según Finney

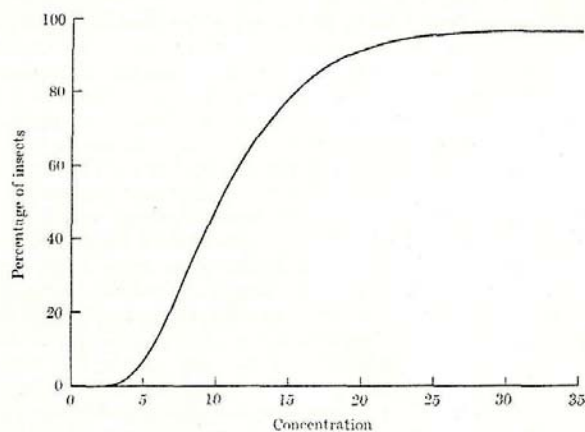


Fig. 2.3. Sigmoid curve derived from Fig. 1, showing percentage of subjects with tolerances less than a specified value.

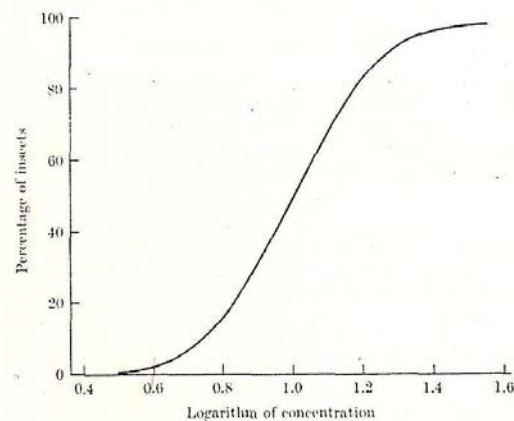


Fig. 2.4. Normal sigmoid curve derived from Fig. 2, showing percentage of subjects with log tolerances less than a specified value.

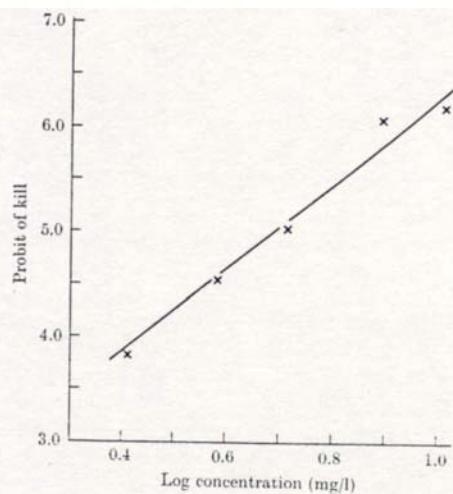


Fig. 3.4. Relation between probit of kill of *M. sanborni* and dose of rotenone (Ex. 1), showing probit regression line from equation (3.9).

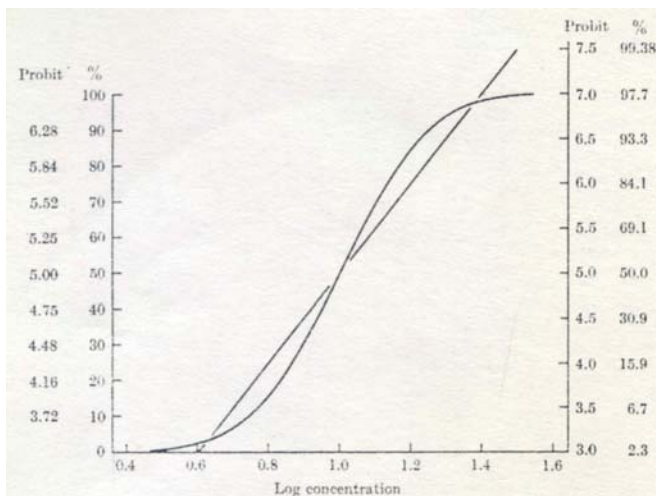


Fig. 3.2. Effect of the probit transformation. The normal sigmoid curve in Fig. 2.4 is transformed to a straight line when the ordinates are measured on a scale linear in probits instead of in percentages.

Figura 11 Comparación de pendientes. Tabla de datos brutos a analizar en Excel

	A	B	C	D	E	F	G
2							
3		Comparacion entre 2 pendientes (b)					
4			Pendiente E 45	96hs		Pendiente E 48	
5							
6		$\sum x^2$	0.614449402		$\sum x^2$	4.020604231	
7		$\sum x*y$	2.197019569		$\sum x*y$	3.315491207	
8		$\sum y^2$	9.239457118		$\sum y^2$	3.257044308	
9		n	11		n	8	
10		b	3.58		b	0.82	
11		Residuo SS	1.3838		Residuo SS	0.5230	
12		Residuo DF	9		Residuo DF	6	
13		a	0.748481793		a	4.882205943	
14		Ymedia	5.276047765		Ymedia	5.282552861	
15		Xmedia	1.266242797		Xmedia	0.485489603	
16		S2x,y	0.12712		t =	5.632966	
17					critical	2.131	
18		Sb1-Sb2	0.4884	0.238504219	v	15	
19							
20							
21							
22		Comparacion entre 2 elevaciones (a)					
23							
24		bc	1.189				
25		Ac	4.635053633		0.359151913		
26		Bc	5.512510775				
27		Cc	12.49650143		0.128990036		
28		SSc	5.940423017				
29		DFc	16				
30		(S2y*x)c	0.371276439				
31							
32		t =	-2.6035		critical	2.120	
33							
34							
35							

Figura 12 Esquema de regresión. Tabla de datos brutos a analizar en Excel

Archivo Edición Ver Insertar Formato Herramientas Datos Ventana ?																
Cerrar pantalla completa																
1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
2	ENSAYO	TIEMPO	CONCENTR	log(d)	probit											
3				X_i	Y_i	X_i^2	X_i^2	Y_i^2	a	b	a	Ex^2	Ey^2	Exy	Promedio	Promedio Y
4	45	30448	6	0.77815125	3.36	2.61081183	0.60551937	11.2570114								
5	45	30448	9	0.95424251	4.33	4.12758517	0.91057877	18.7100336								
6	45	30448	12	1.07918125	4.48	4.82998025	1.16463216	20.0309864								
7	45	30448	15	1.17609126	4.61	5.42728355	1.38319065	21.2952616								
8	45	30448	18	1.25527251	5.67	7.12303174	1.57570906	32.1998409								
9	45	30448	21	1.32221929	6.04	7.98148802	1.74826386	36.4385219								
10	45	30448	24	1.38021124	5.52	7.62484037	1.90498307	30.5190064								
11	45	30448	27	1.43136376	5.67	8.12225989	2.04880223	32.1998409								
12	45	30448	30	1.47712125	6.04	8.91654331	2.1818872	36.4385219								
13	45	30448	33	1.51851394	6.64	10.0903019	2.30588459	44.1540714								
14	45	30448	36	1.5563025	5.67	8.83122355	2.42207747	32.1998409								
15	11	Sumatoria		13.9286708	58.04	75.6853518	18.2515284	315.442937	11	3.575591	0.748482	0.614449	9.239457	2.19702	1.2662428	5.27604776
16				X_i	Y_i	X_i^2	X_i^2	Y_i^2	a	b	a	Ex^2	Ey^2	Exy	Promedio	Promedio Y
17	48	30467	0.1	-1	4.16	-4.1583786		1	17.2921127							
18	48	30467	1	0	5.13	0		0	26.2724055							
19	48	30467	1.5	0.17609126	4.87	0.35832841	0.03100813	23.7591761								
20	48	30467	3	0.47712125	4.87	2.32565051	0.22764469	23.7591761								
21	48	30467	6	0.77815125	5.52	4.29881955	0.60551937	30.5190064								
22	48	30467	9	0.95424251	5.39	5.13890229	0.91057877	29.0016831								
23	48	30467	15	1.17609126	6.29	7.38767699	1.38319065	39.4578804								
24	48	30467	21	1.32221929	6.04	7.98148802	1.74826386	36.4385219								
25	8	Sumatoria		3.83291693	42.26	23.8324872	5.90620547	226.499962	8	0.824625	4.882286	4.020694	3.257044	3.315491	0.4854896	5.28255284
26																
27																
28																
29				X_i	Y_i	X_i^2	X_i^2	Y_i^2	a	b	a	Ex^2	Ey^2	Exy	Promedio	Promedio Y
30	46	30448	9	0.95424251	4.33	4.12758517	0.91057877	18.7100336								
31	46	30448	12	1.07918125	4.61	4.90007495	1.16463216	21.2952616								
32	46	30448	15	1.17609126	5.13	6.02824565	1.38319065	26.2724055								
33	46	30448	18	1.25527251	5.52	6.93462869	1.57570906	30.5190064								
34	46	30448	24	1.38021124	5.39	7.43288068	1.90498307	29.0016831								
35	46	30448	30	1.47712125	5.67	8.38191033	2.1818872	32.1998409								
36	6	120		7.32212002	30.6500625	37.8853255	9.12098091	157.998231	6	2.596551	1.939635	0.185487	1.427176	0.481419	1.22035334	5.10834375
37																
38																
39																
40				X_i	Y_i	X_i^2	X_i^2	Y_i^2	a	b	a	Ex^2	Ey^2	Exy	Promedio	Promedio Y
41	47	30448	3	0.47712125	3.96	1.89110212	0.22764469	15.7098643								
42	47	30448	6	0.77815125	5.25	4.0878982	0.60551937	27.5976502								
43	47	30448	9	0.95424251	5.84	5.57432345	0.91057877	34.1245404								
44	47	30448	12	1.07918125	6.04	6.51440515	1.16463216	36.4385219								
45	47	30448	15	1.17609126	6.04	7.09939594	1.38319065	36.4385219								
46	47	30448	18	1.25527251	6.04	7.67754055	1.57570906	36.4385219								
CONTROL PULCHELLA / DATOS / Regresiones / LC-50 / Compara 2 / Compara 3 / Compara 6 /																

Figura 13 Esquema de los cálculos de LC50. Tabla de datos brutos a analizar en Excel

Archivo Edición Ver Insertar Formato Herramientas Datos Ventana ?												
Cerrar pantalla completa												
	BM	BN	BO	BP	BQ	BR	BS	BT	BU	BV	BW	BX
1												
2												
3		a	2.0293362	a= ordenada al origen								
4		b	3.1108265	b= pendiente de la regresión								
5		t	2.7764509	t= valor de t(student) para (0,05); gl(n-2)								
6		Ex2	0.2675466									
7		Sb	0.1687434									
8		Sy2x	0.0872824	Sy2x= Error típico tirado por la regresión. (MS=SS/DF)								
9		Yi	5	Yi= Valor de y del que queremos predecir x								
10		Y(media)	5.9169419	Y(media)= al promedio de los valores de Y								
11		X(media)	1.2497019	X(media)= al promedio de los valores de X								
12		k	9.457742									
13		n	6	n= al numero de datos								
14		v	4									
15		Ex	7.4982113	Ex= a la sumatoria de xi								
16		Ex2	9.6380753	Ex2= a la sumatoria de los cuadrados de los xi								
17		Err. Tip2	0.0076182	Err. Tip2= Sy2x								
18		pre Sb	0.0284743									
19												
20												
21		t1	-0.3015992									
22		t2	0.2935638	PROM 1.1835								
23		t3	0.0076182	DESV 0.0077782								
24		t4	3.1425649	LIMITES 0.0107798								
25		t5	11.034032	1.11237	1.1942798 15.642							
26		t6	1.2373671		1.1727202 14.884							
27		t7	0.3265516									
28		t8	0.9481027	como crVI								
29		LCI	0.622	Inv.Log->	4.184	LCI	1.46					
30		LCS	1.275	Inv.Log->	18.822	LCS	6.59					
31		E-C50	0.955	Inv.Log->	9.015	E-C50	3.16					
32												

Inicio

Explorando - ...

Ley y com Ca...

Capítulo IV NI...

Microsoft ...

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

98

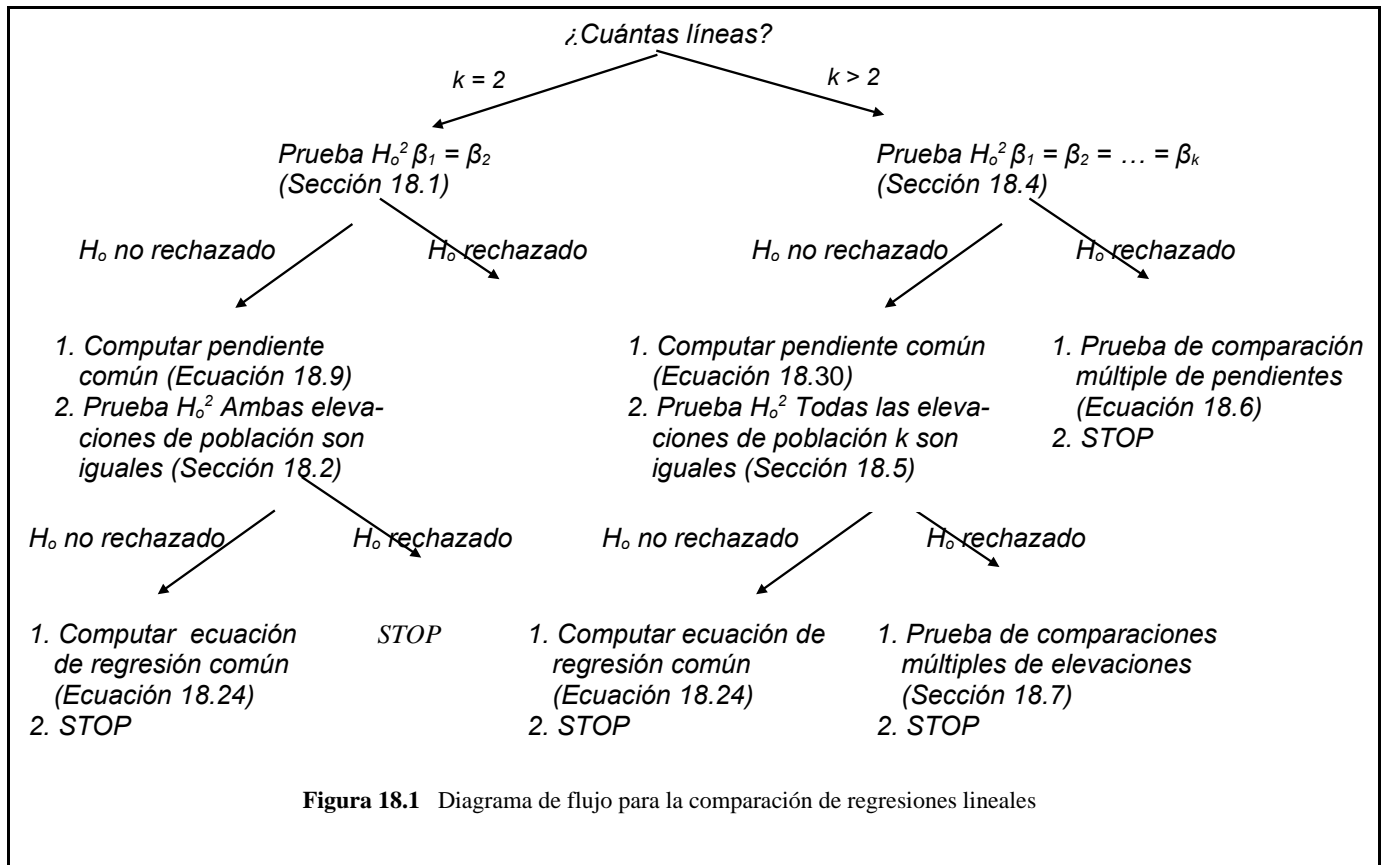
98

98

98</

Para comparar las rectas calculadas a partir de diferentes grupos de datos, se siguió el esquema propuesto por Zar (1999) que se muestra en la Figura 14.

Figura 14 Esquema de Zar (comparación de curvas). Capítulo 18



Finalmente, en los casos en que alguno de los parámetros de las comparaciones efectuadas mostraron diferencias significativas, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples *a posteriori* (Figura 15, página siguiente).

El ajuste a los modelos de regresión y Probit, se corroboró por medio del *EPA Probit Program*, versión 1.5, el cual antes de estimar las curvas dosis-respuesta para cada conjunto de datos, realiza la prueba de significancia para la pendiente y la prueba de bondad de ajuste (prueba de CHI-cuadrado) para la adecuación de los datos al modelo Probit (Figura 16, página subsiguiente). Este ajuste, como se mencionó anteriormente, fue uno de los criterios de aceptación *a posteriori* utilizados en la elección de curvas D-R.

Figura 15 Esquema de comparaciones múltiples *a posteriori*. Tabla de datos brutos a analizar en Excel

Archivo Edición Ver Insertar Formato Herramientas Datos Ventana ?															
Cerrar pantalla completa															
	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
22															
23	par pendientes...														
24															
25							t1e	t3e	Comparaciones B-A		Calculos de g		3.39		
26	comp entro REG1 Y REG2	0.101529084	(S*2yx)p				3.946310699	0.195256201					Aceptación/Rechazo		
27					SE	0.44187884			2.33		5.264947069	5.264947069	R	3.39	
28	comp entro REG1 Y REG3	0.101529084	(S*2yx)p				4.075317378	0.206881621							
29					SE	0.45484241			-2.38		-5.22259941	5.22259941	R	3.39	
30	comp entro REG1 Y REG4	0.101529084	(S*2yx)p				4.075317378	0.206881621							
31					SE	0.45484241			0.77		1.698057238	1.698057238	A	3.39	
32	comp entro REG1 Y REG5	0.101529084	(S*2yx)p				9.069984998	0.460433635							
33					SE	0.67855526			-1.18		-1.745447794	1.745447794	A	3.39	
34	comp entro REG1 Y REG6	0.101529084	(S*2yx)p				11.70693264	0.594297125							
35					SE	0.77888669			3.26		4.226946999	4.226946999	R	3.39	
36	comp entro REG2 Y REG3	0.101529084	(S*2yx)p				5.446479654	0.276488046							
37					SE	0.52582131			-4.70		-8.94205722	8.94205722	R	3.39	
38	comp entro REG2 Y REG4	0.101529084	(S*2yx)p				5.446479654	0.276488046							
39					SE	0.52582131			-1.55		-2.955597307	2.955597307	A	3.39	
40	comp entro REG2 Y REG5	0.101529084	(S*2yx)p				10.44114727	0.53004006							
41					SE	0.7248385			-3.51		-4.822330992	4.822330992	R	3.39	
42	comp entro REG2 Y REG6	0.101529084	(S*2yx)p				13.07809591	0.66390355							
43					SE	0.81488277			0.93		1.143978975	1.143978975	A	3.39	
44	comp entro REG3 Y REG4	0.101529084	(S*2yx)p				5.675488332	0.288113465							
45					SE	0.53676202			3.15		5.864439097	5.864439097	R	3.39	
46	comp entro REG3 Y REG5	0.101529084	(S*2yx)p				10.67015395	0.541665479							
47					SE	0.73597927			1.19		1.618362946	1.618362946	A	3.39	
48	comp entro REG3 Y REG6	0.101529084	(S*2yx)p				13.30710259	0.67552897							
49					SE	0.82198569			5.63		6.854851452	6.854851452	R	3.39	
50	comp entro REG4 Y REG5	0.101529084	(S*2yx)p				10.67015395	0.541665479							
51					SE	0.73597927			-1.96		-2.658670817	2.658670817	A	3.39	
52	comp entro REG4 Y REG6	0.101529084	(S*2yx)p				13.30710259	0.67552897							
53					SE	0.82198569			2.49		3.024961731	3.024961731	A	3.39	
54	comp entro REG5 Y REG6	0.101529084	(S*2yx)p				18.30177021	0.929080984							
55					SE	0.96388847			4.44		4.609412811	4.609412811	R	3.39	
56	par elevaciones...														
57							tukey test...								
58							G2	G3	G5	Regresion	slope(b)	a	n	Y PROM	
59	comp entro REG1 Y REG2	0.192986579	(S*2yx)c				0.14973262	0.01067089	0.0099569	f	3.35	1.027	17	5.2168	
60		0.096493289	0.015312474		SE	0.12374358		1.191359684	0.158689521						
61															
62	comp entro REG1 Y REG3	0.192986579	(S*2yx)c				0.158823529	0.009025	0.007777323	2	5.68	-1.589	11	2.1766	
DATOS Regresiones LC-50 Compara 2 Compara 3 Compara 6 Hoja1 Resultados															

Figura 16 Esquema *Probit Program*, versión 1.5, verificación de supuestos.
Tabla de datos brutos a analizar en Excel

39sg96 - Bloc de notas				
Archivo Edición Buscar Ayuda				
CONTRASTACION DE SUPUESTOS				
Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 4.875				
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level) = 27.587				
Mu = 1.086945				
Sigma = 0.178440				
Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits	
Intercept	-1.091389	0.803818	(-2.666872,	0.484093)
Slope	5.604135	0.684584	(4.262351,	6.945920)
Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000				
39sg96				
Estimated LC/EC Values and Confidence Limits				
Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits		
		Lower	Upper	
LC/EC 1.00	4.697	3.238	5.943	
LC/EC 5.00	6.215	4.654	7.490	
LC/EC 10.00	7.215	5.638	8.487	
LC/EC 15.00	7.980	6.411	9.242	
LC/EC 50.00	12.216	10.812	13.524	
LC/EC 85.00	18.702	16.809	21.470	
LC/EC 90.00	20.684	18.419	24.262	
LC/EC 95.00	24.014	20.993	29.218	
LC/EC 99.00	31.772	26.610	41.750	

Se mencionan a continuación algunas consideraciones a tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos a partir de la prueba de significancia propuesta para la comparación de curvas D-R, (rectas de regresión lineal) y sus correspondientes pruebas *a posteriori* (Figuras 14 y 15).

Cuando las pendientes son iguales, estaríamos asumiendo que los organismos prueba expuestos responden de la misma forma. De esta manera las diferencias significativas entre las LC50 calculadas, estarían relacionadas con las diferencias existentes en las ordenadas al origen. El desplazamiento del parámetro *a* sobre el eje de las ordenadas, genera un desplazamiento de toda la curva D-R proporcional al desplazamiento de la LC50, por lo que diferencias en las ordenadas al origen reflejarían diferencias entre las LC50 calculadas a partir de estas curvas, o dicho de otro modo sensibilidades significativamente diferentes.

Si nuestros supuestos se basan en que el mismo organismo prueba (misma especie) responde de la misma manera, no deberíamos encontrar diferencias entre las pendientes. En el caso que existan diferencias entre pendientes, éstas se adjudicarán a diferencias en la forma de respuesta de los organismos evaluados, la que estaría determinada por el efecto de los distintos factores modificantes de la toxicidad (bióticos y abióticos). La existencia de diferencias entre las pendientes de las curvas D-R, al contrario de lo que ocurre con las ordenadas al origen, en algunos casos muestran diferencias significativas entre LC50 muy similares. Lo mismo sucede en los casos en que dos curvas D-R poseen diferencias entre ambos parámetros, siendo su interpretación aún más dificultosa.

Por último, cuando no difieren ambos parámetros, estaríamos en presencia de que las diferencias observadas en las LC50 se deben al azar; dicho de otro modo, no existirían respecto a la sensibilidad de ambos grupos de organismos expuestos.

En los casos en los que no se pudo realizar comparaciones de curvas D-R, debido a que en uno o en ambos grupos, las mismas no pudieron ser aceptablemente estimadas, se efectuaron siguiendo la metodología propuesta por Zar (1999). La prueba de *t* para diferencias de medias, en los casos en que existía un mínimo de $n=3$ en cada grupo y la prueba de “*t*” **pareado**, entre dos grupos de datos. El caso de la prueba de “*t*” **pareado**, se aplicó para comparar ensayos realizados con una misma puesta en dos tiempos distintos, asumiendo que la puesta es un mismo organismo y que al mismo se le mide la sensibilidad en dos tiempos diferentes con una misma metodología. De esta manera se genera la dependencia de pares ordenados que la metodología pareada o emparejada plantea. En el caso en que no se pudo emplear las unidades Probit se utilizó la transformación arcoseno de las proporciones.

El análisis estadístico empleado en los experimentos crónicos, consistió en analizar el efecto de factores tales como la concentración del tóxico (Cr(VI)) y la edad de los organismos al comienzo de la exposición (experimento 1) y estadio de exposición (experimento 2) sobre las variables de la respuesta: supervivencia, crecimiento y desarrollo. Los análisis incluyeron tres tipos de ensayos hipotéticos: ANCOVA de dos factores (en todos los puntos finales medidos durante el experimento empleando el tiempo de exposición y la edad de los organismos como co-variables), ANOVA de dos factores (para comparar los grupos de edad en cada uno de los siete momentos de medición del experimento), y ANOVA de una vía, con la prueba *a posteriori* de Dunnett (para comparar el efecto de la exposición a cada tratamiento respecto al grupo control) (Zar, 1999). Fueron también estimados el límite de tolerancia media (tiempo para alcanzar el 50% de mortalidad), y las concentraciones de Cr(VI) NOEC y LOEC, (USEPA, 1989). Las variables adicionales medidas en el momento de la primera metamorfosis (peso y desarrollo) fueron analizadas empleando un ANOVA de dos factores (para determinar el efecto de los distintos factores evaluados sobre el peso); ANOVA simple con prueba *a posteriori* de Dunnett (para ver el efecto de la exposición en cada grupo de edad), y las pruebas no paramétricas de Friedman y Kruskal-Wallis (para evaluar el efecto de los factores sobre el desarrollo promedio por recipiente

de ensayo). Los datos de la tasa de supervivencia por cámara de ensayo sometida a exposición crónica fueron transformados angularmente antes del análisis estadístico de los resultados (Zar, 1999).

3. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En este ítem se presentarán los resultados obtenidos junto con algunas conclusiones parciales producto de la interpretación de los datos. Las conclusiones finales serán abordadas en el capítulo final, junto con la discusión general de los demás capítulos.

Los resultados obtenidos con la totalidad de los ensayos realizados ($n=28$) se mostraron con anterioridad en la Tabla 5, junto con los criterios de su aceptación. En la Tabla 6 y en la Figura 17 (próximas páginas) se muestra la distribución de frecuencias de las concentraciones ensayadas, de los 0 y 100% de mortalidad obtenidos en cada ensayo, además de las $LC50_{96h}$ calculadas en los diferentes bioensayos realizados.

Los resultados obtenidos a partir de la totalidad de ensayos realizados con esta especie muestran que los efectos letales se encuentran a partir de 1,75 y 17,5 mg Cr(VI)/L (0% de efecto) hasta entre 15,75 y 60 mg Cr(VI)/L (100% de efecto) en el 80% de los casos (Tabla 6 y Figura 17, páginas siguientes). Estos resultados están a favor de la H2: “El intervalo de concentraciones de cromo en el que se observan efectos letales (0-100%) se encuentra a bajas concentraciones, en el orden de las partes por millón”.

La variabilidad total (VT) de los ensayos realizados ($n=28$), se ilustra en la Figura 18 (página subsiguiente, utilizando el diseño de las cartas control¹⁰, como una forma de mostrar la VT presente entre los ensayos. Debido a que, como se mostró en la Tabla 5, en 5 casos las $LC50$ no pudieron ser calculadas, se exhiben los resultados de 23 ensayos.

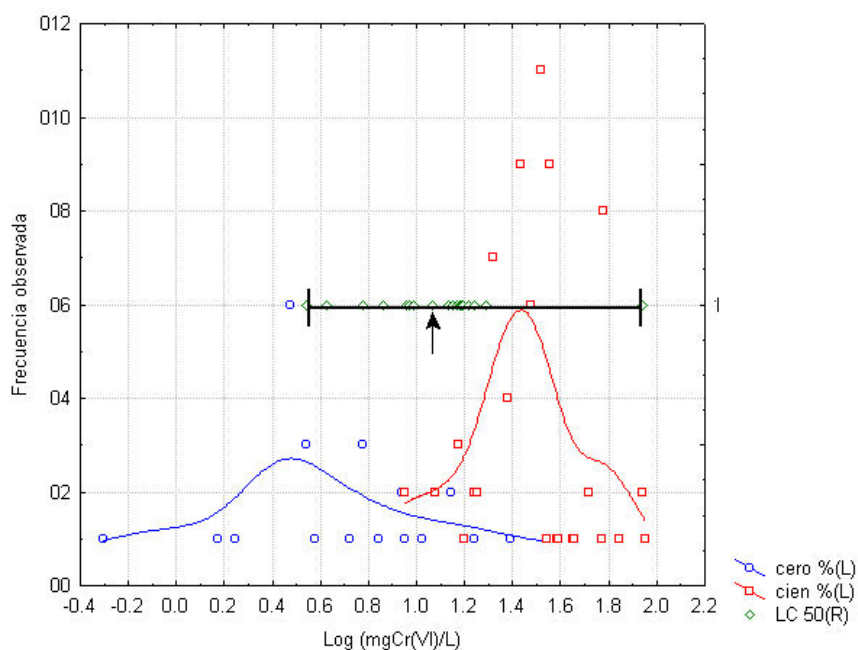
¹⁰ La carta control es un gráfico utilizado para un seguimiento de los cambios a través del tiempo hasta el punto final medido para un compuesto tóxico de referencia. En el eje de las X se grafica la fecha de ensayo y en el eje de las Y, la concentración tóxica efectiva. Se toman como límite de alerta dos desviaciones estándar de la media histórica de la concentración letal media.

Tabla 6 Distribución de frecuencias

RELACIÓN CONCENTRACIÓN-EFECTO A 96 hs. DE ENSAYO						
Concentración	Frecuencia			Frecuencia Acumulada %		
	0%	100%	Total	0%	100%	Total
0,00	34		40			
0,10			1	0	0	0
0,50	1		3	4	0	2
1,00			2	4	0	2
1,50	1		3	7	0	4
1,75	1		2	11	0	5
3,00	6		11	33	0	9
3,50	3		3	44	0	10
3,80	1		1	48	0	11
4,20				48	0	11
5,25	1		3	52	0	12
5,96				52	0	12
6,00	3		8	63	0	15
7,00	1		2	67	0	16
7,26				67	0	16
8,75	2		3	74	0	17
9,00	1	2	16	78	3	24
9,10				78	3	24
9,29				78	3	24
9,72				78	3	24
10,50	1		3	81	3	25
11,60				81	3	25
12,00		2	14	81	5	31
12,25			3	81	5	32
13,63				81	5	32
14,00	2		3	89	5	34
14,18				89	5	34
14,82				89	5	34
15,00		3	16	89	9	40
15,06				89	9	40
15,44				89	9	40
15,53				89	9	40
15,75		1	3	89	10	41
16,54				89	10	41
17,50	1	2	5	93	13	44
18,00		2	14	93	15	49
19,25			1	93	15	50
19,37				93	15	50
21,00		7	17	93	24	57
22,75			1	93	24	57
23,92				93	24	57
24,00		4	14	93	29	63
24,06				93	29	63
24,50	1		2	96	29	64
26,75			1	96	29	64
27,00		9	17	96	41	71
29,59				96	41	71
30,00		6	15	96	49	78
31,50			1	96	49	78
33,00		11	15	96	63	84
35,00	1	1	2	100	64	85
36,00		9	14	100	76	91
38,50		1	1	100	77	91
39,00		1	2	100	78	92
45,00		1	1	100	79	93
45,50		1	1	100	81	93
52,50		2	3	100	83	94
59,50		1	1	100	85	95
60,00		8	8	100	95	98
62,92				100	95	98
70,00		1	2	100	96	99
87,50		2	2	100	99	100
90,00		1	1	100	100	100

En negrita se indican los valores de LC50 estimados experimentalmente

Figura 17 Distribución de frecuencias de las concentraciones ensayadas y los efectos producidos en cada una de ellas



Referencias: Línea azul: distribución de frecuencias del 0% de mortalidad; línea roja: distribución de frecuencias del 100% de mortalidad; línea negra: intervalo de las LC₅₀_{96h} estimadas (rombos); flecha: promedio de dichas estimaciones

Figura 18 Carta control de la variabilidad total de los ensayos con *H. pulchellus*

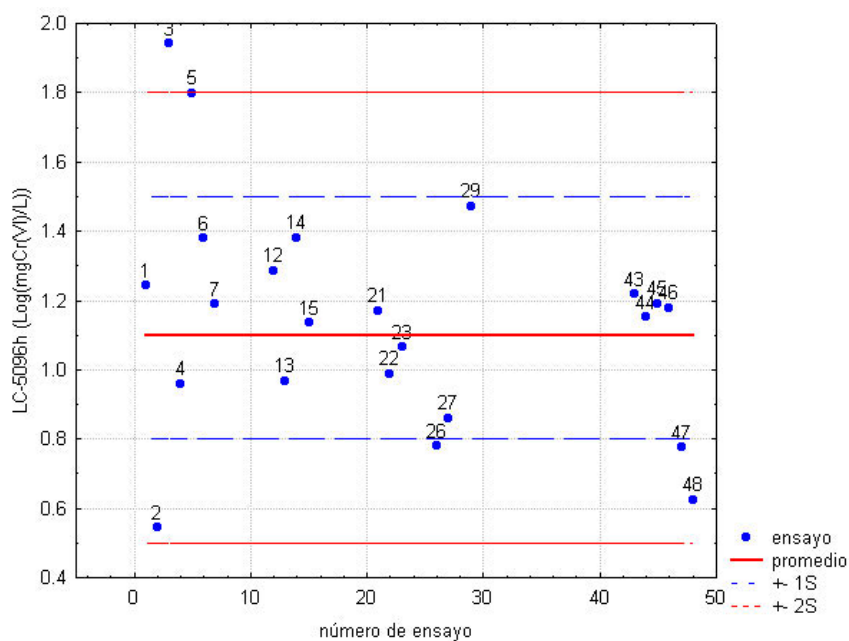


Tabla 7 Análisis estadístico descriptivo de la variabilidad total

	N	PROMEDIO	LCI	LCS	MIN	MAX	RANGO	STD DEV.	C.V.	F.V.	%
LOG (mg Cr(IV)/L)	23	1,14	1,00	1,29	0,54	1,94	1,4	0,33	0,29	1,29	12,72
mg Cr(VI)/L	23	13,91	10,01	19,33	3,50	87,50	84,00	2,14	0,15	1,93	33,50

Referencias:

LCI, LCS: se refiere a los límites de confianza inferior y superior al 95%. **MIN:** valor mínimo. **MAX:** valor máximo. **STD DEV.:** desvío estándar. **C.V:** coeficiente de variación. **F.V:** factor de variación. **%:** porcentaje de variación.

En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico descriptivo de la variabilidad total. Estos muestran para las LC50's calculadas un **CV** de 0,29 y un **FV** de 1,93, lo que indica una variabilidad del 33,50%.

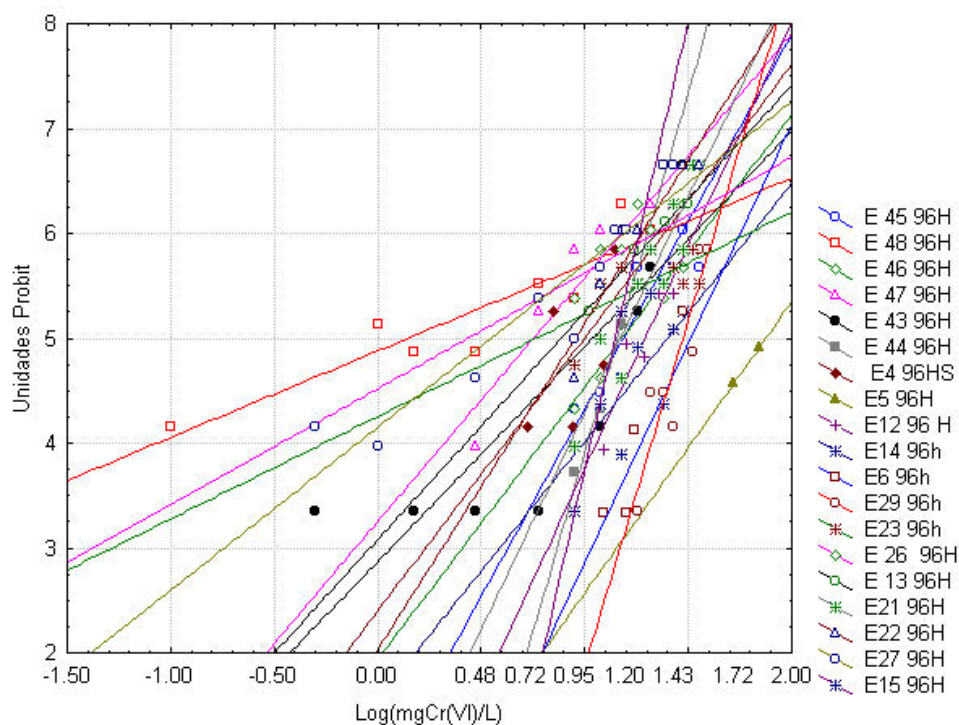
Como se refleja en la Figura 18 y en las Tablas 6 y 7, los resultados muestran una gran variabilidad que excede los límites propuestos como aceptables, lo cual es esperable si consideramos la explicación mencionada en la introducción sobre la composición de la variabilidad total. Sin embargo, cabe mencionar que al comienzo de la investigación, no se contemplaba la posibilidad de que una misma especie respondiera de manera distinta, en las diferentes charcas y bajo los diferentes factores modificantes bióticos, ecológicos y/o geográficos. Estas hipótesis surgieron durante el transcurso de la investigación. El análisis de la variabilidad total, además de ser una forma de contrastar dichas hipótesis en conjunto, constituye el punto de partida para continuar al análisis de las demás. Si luego de la prueba rechazamos la hipótesis alternativa - no existen diferencias entre las curvas -, no tiene sentido contrastar las demás hipótesis, debido a que no existirían diferencias entre los distintos factores modificantes y la investigación terminaría allí. La contrastación de todas las curvas analizadas mostró diferencias muy altamente significativas ($p < 0,0001$) entre las curvas D-R para sus dos parámetros **a** y **b**.

Parte de la variabilidad evaluada anteriormente fue aportada por las curvas D-R, de los ensayos que no cumplieron con los criterios de aceptación. Para eliminar esta variación, se realizó una selección de ensayos cuyos resultados se resumen en la Tabla 8 (página siguiente). El recorte involucró a un 46% de los ensayos realizados, quedando un total de 13 ensayos aceptados. Los análisis estadísticos que involucraron curvas descartadas se reformularon y se volvieron a realizar. En la Figura 19 (página siguiente) se muestra la totalidad de las curvas D-R estimadas de los ensayos seleccionados ($n=13$).

Tabla 8 Resultados de las curvas seleccionadas

Ens N°	mg Cr(VI)/L	LCI	LCS	RANGO	F.V.	%
12	19,4	16,614	23,096	6,5	1,4	17
13	9,3	5,635	12,202	6,6	2,2	35
21	14,8	12,539	16,757	4,2	1,3	14
22	9,7	7,391	11,422	4,0	1,5	21
23	11,6	8,654	14,254	5,6	1,6	24
27	7,3	4,852	9,282	4,4	1,9	31
29	29,6	27,458	31,942	4,5	1,2	8
43	16,5	14,307	18,268	4,0	1,3	12
44	14,2	12,945	15,333	2,4	1,2	8
45	15,5	13,485	17,527	4,0	1,3	13
46	15,1	13,149	17,009	3,9	1,3	13
47	6,0	4,181	7,073	2,9	1,7	24
48	4,2	2,255	6,249	4,0	2,8	48

Figura 19 Comparación de todas las curvas seleccionadas (todas regresiones)



En la Tabla 9 (página siguiente) se muestran los parámetros de las regresiones y correlaciones realizadas para cada una de esas curvas.

Tabla 9 Parámetros de las regresiones y correlaciones realizadas para cada una de las curvas D-R seleccionadas

Número	BIOENSAYO	r^2	r	p	a	b	n
4	E 4	0,3779	0,6147	0,194*	2,40005012	2,60492051	6
5	E 5	1,0000	1,0000	1,000*	-0,20927333	2,77796697	2
6	E 6	0,5298	0,7279	0,481*	-1,32458994	4,18337377	3
12	E 12	0,8510	0,9225	0,030	-0,49449777	4,25338315	5
13	E 13	0,9858	0,9929	0,010	3,08041632	2,16736519	4
14	E 14	0,3937	0,6274	0,131*	1,55149900	2,46308798	7
21	E 21	0,8835	0,9400	0,000	0,16475981	4,12409179	10
22	E 22	0,8812	0,9387	0,010	2,02933621	3,11082651	6
23	E 23	0,3957	0,6291	0,050	4,25622451	0,97628362	10
26	E 26	0,3285	0,5731	0,179*	4,52136253	1,10395500	7
27	E 27	0,8836	0,9400	0,000	4,15202844	1,55293393	10
29	E 29	0,8202	0,9056	0,000	-4,74438424	6,61032506	8
43	E 43	0,6684	0,8175	0,000	2,87045650	2,05233319	11
44	E 44	0,9870	0,9935	0,000	-2,95363218	6,86176967	5
45	E 45	0,8502	0,9221	0,000	0,74848179	3,57559070	11
46	E 46	0,8759	0,9359	0,010	1,93963465	2,59655052	6
47	E 47	0,8776	0,9368	0,000	3,25239516	2,32624549	8
48	E 48	0,8394	0,9162	0,000	4,88220594	0,82462511	8

Los valores en negrita (*) indican correlaciones no significativas

La significancia de la correlación (p), fue incorporada como un criterio de aceptación *a posteriori*, en la Tabla 5. En la columna encabezada “Ajuste” se indica con un asterisco las curvas cuyas correlaciones resultaron no-significativas ($p < 0,05$). Este mismo criterio fue empleado para reconsiderar excepcionalmente como aceptables, debido a que presentaron correlaciones significativas, a los ensayos 13 y 48, que habían sido rechazados por presentar alta variabilidad en sus estimaciones. (en la Tabla 5, indicados como R^{**}). Para el resto de los ensayos, este criterio coincidió con los anteriores.

La variabilidad total de los ensayos aceptados por los criterios de selección se ilustra en la Figura 20, utilizando el mismo diseño de cartas control que la Figura 18, para mostrar disminución de la variabilidad total entre los ensayos aceptados ($n=13$).

Figura 20 Carta control de la variabilidad de los ensayos seleccionados realizados con *H. pulchellus*

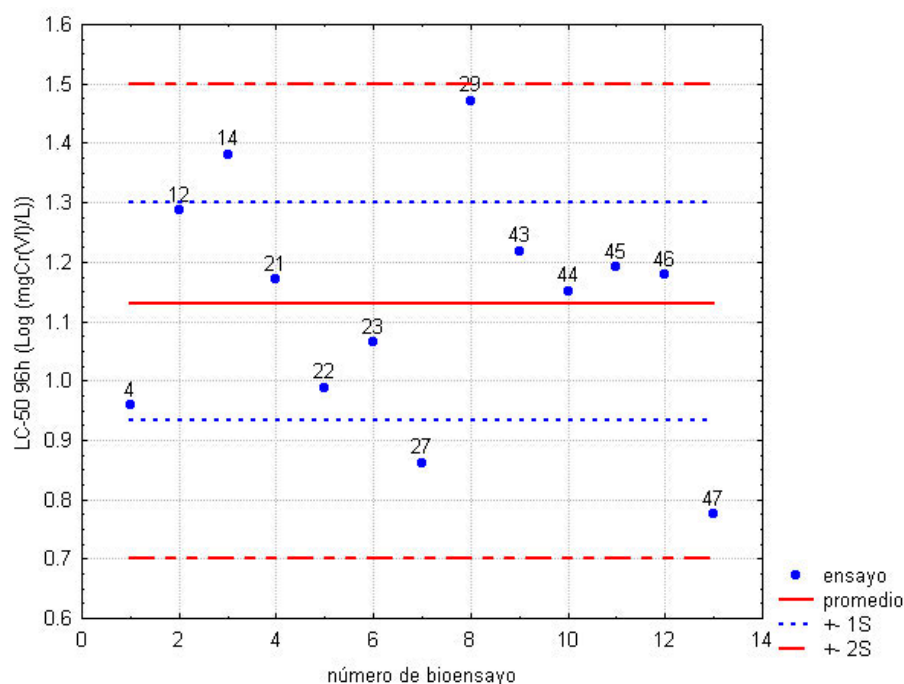


Tabla 10 Análisis estadístico descriptivo de la variabilidad total para los ensayos aceptados

	N	PROMEDIO	LCI	LCS	MIN	MAX	RANGO	STD DEV.	C.V.	F.V.	%
LOG (mg Cr(IV)/L)	13	1,07	0,94	1,21	0,62	1,47	0,85	0,23	0,21	1,29	39,51
mg Cr(VI)/L	13	11,83	8,62	16,23	4,20	29,59	25,39	1,69	0,14	1,88	32,17

Referencias:

LCI, LCS: se refiere a los límites de confianza inferior y superior al 95%. **MIN:** valor mínimo. **MAX:** valor máximo. **STD DEV.:** desvío estandar. **C.V:** coeficiente de variación. **F.V:** factor de variación. **%:** porcentaje de variación.

Los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico descriptivo de la variabilidad total para los ensayos aceptados muestran para las LC50's calculadas un **CV** de 0,21 y un **FV** de 1,88, lo que indica una variabilidad del 32,17 % (Tabla 10). Esta variabilidad se encuentra levemente por fuera de los límites propuestos como aceptables. En principio, esto permitiría concluir que los renacuajos de *H. pulchellus* poseen una sensibilidad promedio, estimada a partir de la LC50, de 11,83 mg Cr(VI)/L y que esta sensibilidad promedio estaría en el 95% de los casos entre 8,62 y 16,23 mg Cr(VI)/L, pudiendo variar sus valores entre 4,20 y 29,59 mg Cr(VI)/L como valores extremos. Si además consideramos que las LC50 fueron calculadas a partir de bioensayos realizados con larvas de diferentes edades,

condiciones y orígenes, y en condiciones de laboratorio diferentes, podemos afirmar que los resultados son aceptables y fundamentan en favor de la hipótesis **H4a**: “Los ensayos estandarizados de *H. pulchellus*, poseen una variabilidad aceptable y una alta precisión, por lo que son adecuados para el desarrollo de una herramienta bioanalítica”.

Respecto a la **Hipótesis Poblacional**, los resultados de la selección de curvas D-R representativas para cada población establecida, resultante del análisis estadístico exploratorio, se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11 Selección de curvas D-R para contrastar la Hipótesis Poblacional

Selección de ensayos analizados					Parámetros de regresión y correlación						mg Cr (VI)/L	LCI – LCS 95%
Ens. Nº	Población	Diseño	Criterio	Curva evaluada	a	b	n	r	r ²	p		
45	FRI	NORMAL	A	FRI 4546	1,0270	3,3517	17	0,9178	0,8424	0,00	15,32	9,194 – 25,489
46	FRI	NORMAL	A									
23	PIL	NORMAL	A	E 23	4,2562	0,9763	10	0,6291	0,3957	0,05	11,60	8,654 – 14,254
21	ARR	NORMAL	A	E 21	0,1648	4,1241	10	0,9400	0,8835	0,00	14,8	12,539 – 16,757
43	MOL	FETAX	A	MOL 4344	-1,5894	5,6782	11	0,9637	0,9287	0,00	14,47	10,595 – 19,768
44	MOL	NORMAL	A									
29	BRY	NORMAL	A	E 29	-4,7444	6,6103	8	0,9056	0,8202	0,00	29,59	27,458 – 31,942
13	ATA	NORMAL	R**	E 13	3,0804	2,1674	4	0,9929	0,9858	0,01	9,29	5,635 – 12,202

Los resultados de la comparación de pendientes y ordenadas al origen mostraron diferencias muy altamente significativas $p < 0,0001$, indicando que las curvas D-R son diferentes entre las distintas poblaciones (Tabla 12, página siguiente). Los resultados de la prueba de comparaciones múltiples para las pendientes y para las ordenadas al origen, se muestran en las Tablas 13 y 14 (página siguiente), respectivamente.

Tabla 12 Resultado de la comparación de pendientes (todas con todas)

Ho	F. Crítico	F	p
b1 = b2 = b3 = b4 = b5 = b6	2,40851250	10,5484900	0,0000
a1 = a2 = a3 = a4 = a5 = a6	3,17162119	10,7317657	0,0001

HIPÓTESIS NULA	CRITERIO		CONCLUSIONES
	Pendientes	Elevaciones	
FRI=MOL=PIL=ARR=ATA=BRY	R	R	R
FRI=MOL	R	R	R
FRI=PIL	R	A	R
FRI=ARR	A	A	A
FRI=ATA	A	A	A
FRI=BRY	R	R	R
MOL=PIL	R	R	R
MOL=ARR	A	R	R
MOL=ATA	R	R	R
MOL=BRY	A	R	R
PIL=ARR	R	A	R
PIL=ATA	A	A	A
PIL=BRY	R	R	R
ARR=ATA	A	A	A
ARR=BRY	A	R	R
ATA=BRY	R	R	R

Tabla 13 Comparación múltiple de pendientes

Comparación de pendientes, valor crítico (q.0,05, n-1, k) = 3,39						
	1 FRI	2 MOL	3 PIL	4 ARR	5 ATA	6 BRY
1 FRI	0					
2 MOL	5,26494707	0				
3 PIL	-5,22259941	-8,94205722	0			
4 ARR	1,69805724	-2,95559731	5,86443910	0		
5 ATA	-1,74544779	-4,82233099	1,61836295	-2,65867082	0	
6 BRY	4,22694700	1,14397897	6,85485145	3,02496173	4,60941281	0

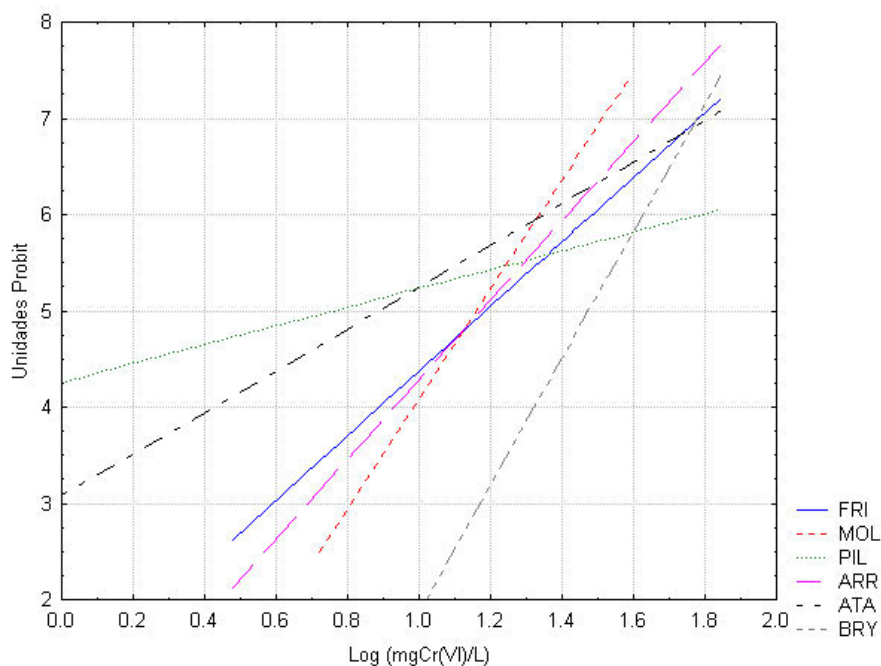
Referencias: En el cuerpo de la tabla se muestran los valores de q para cada comparación. En negrita se indican aquellos valores que resultaron significativos para un nivel de significancia de 0,05

Tabla 14 Comparación múltiple de ordenadas al origen

Comparación de elevaciones, valor crítico (q.0,05, n-1, k) = 3,39						
	1 FRI	2 MOL	3 PIL	4 ARR	5 ATA	6 BRY
1 FRI	0					
2 MOL	21,57875360	0				
3 PIL	0,13440580	12,66907850	0			
4 ARR	0,81109175	13,84188130	0,81836526	0		
5 ATA	2,20010517	12,21410730	2,11929828	1,51585445	0	
6 BRY	5,57196669	5,81111176	5,24298020	5,80962780	5,57486720	0

Referencias: En el cuerpo de la tabla se muestran los valores de q para cada comparación. En negrita se indican aquellos valores que resultaron significativos para un nivel de significancia de 0,05

Figura 21 Comparación de las curvas D-R poblacionales (n=6)



En la Figura 21 se representan las curvas D-R estimadas para cada población analizada. Los resultados no denotan una tendencia en cuanto a las respuestas, y en principio permiten interpretar que todas las poblaciones responden de manera diferente respecto a los dos parámetros evaluados (**a** y **b**). Si bien no se pueden realizar agrupamientos claros entre las poblaciones, el análisis efectuado permite afirmar que los pares de poblaciones ARR- FRI, ARR –ATA, ATA-FRI y ATA-PIL responden de la misma manera y no muestran diferencias significativas en sus sensibilidades, mientras que el resto de las combinaciones difieren en al menos uno de los parámetros evaluados, siendo sus sensibilidades significativamente diferentes, respecto a la contrastación de la denominada **Hipótesis Poblacional** que incluye a **H4b**: “Las distintas poblaciones de *H. pulchellus* poseen diferentes sensibilidades”. Si seguimos con el razonamiento iniciado en el ítem 2.1.e b) Las variaciones del diseño experimental planificadas, a partir de la interpretación de los resultados hasta aquí presentados, estaríamos en condiciones de afirmar que: las distintas poblaciones, definidas como poblaciones aisladas, pertenecientes a una misma especie, que habitan en regiones diferentes en ambientes y charcas diferentes, poseen diferencias en su sensibilidad. Estas diferencias se fundamentan en su magnitud, cuando consideramos las concentraciones letales de Cr(VI) y las ordenadas al origen de las curvas D-R, y/o en su forma de respuesta, si consideramos las pendientes. Dicho de otro modo, las distintas poblaciones de *H. pulchellus* responden de manera diferente.

La **Hipótesis Estacional H4c**: “Las larvas de *H. pulchellus* extraídas de un mismo ambiente presentan diferentes respuestas a lo largo del año” y su predicción **Pr4c1**: “Las larvas invernales de *H. pulchellus*, poseen menor sensibilidad que las

larvas primaverales” se contrastaron a partir de las estimaciones de LC50 de las curvas que se detallan en las Tablas 2 y 15 mediante una prueba de “*t*” para diferencias de medias, comparando las LC50 de las tres poblaciones como réplicas de estacionalidad. Los resultados no arrojaron diferencias significativas $p = 0,25$, posiblemente debido a la variabilidad explicada por las diferentes poblaciones. Sin embargo, al realizar comparaciones de curvas D-R por separado contrastando las diferencias de sensibilidad respecto a la estación dentro de cada población (Tabla 15), los resultados muestran diferencias significativas en la estacionalidad, siendo en dos casos mayor la sensibilidad de las larvas de verano y en uno de ellos lo contrario. Si consideramos los criterios de aceptación de las estimaciones presentados en la Tabla 5, los que se establecieron luego de la realización de estas comparaciones, deberíamos descartar por falta de precisión y alta variabilidad en respuesta a los ensayos 6 y 15, eliminando dos de las comparaciones realizadas. Sólo sería aceptable la comparación entre las curvas MOL1214 (invernal) y MOL 4344 (primaveral), las que muestran evidencias en favor de que las larvas invernales son más resistentes que las primaverales.

La denominada hipótesis conjunta: Desarrollo, Edad, Tamaño, denominada anteriormente como **Hipótesis DET**, que involucra a las hipótesis de desarrollo, edad y tamaño (**H4d, Pr4d, H4e y H4f**), se contrastó parcialmente de a pares en ocho oportunidades como lo expresado en las Tablas 2 y 16 (página siguiente). Aquí se muestran en detalle las comparaciones asociadas a la hipótesis **DET**, además de los resultados de estas comparaciones.

En la página siguiente se presentan las interpretaciones de los resultados obtenidos a partir de las comparaciones entre curvas D-R (denominadas por el número de ensayo **E--**) de distintas etapas del desarrollo larval, comenzando por las que incluyeron las etapas más tempranas (huevos y embriones) (Tabla 16).

Tabla 15 Resultados de las comparaciones de pendientes de la Hipótesis Estacional

Hipótesis	Denominación	Curvas D-R	Diseño	Método	Prueba de hipótesis			
					Hipótesis nula	STD prueba	Valor crítico	Accept/Rech
H4c y Pr4c1	Hipótesis Estacional	FRI4546 y E6	invierno-verano	prueba de “t de diferencia de medias	Las medias son iguales	-1,602	4,303	A
		MOL4344 y MOL1214	invierno-verano					
		E21 y E15	invierno-verano					
		FRIS4546 y E6	invierno-verano	comparación de regresiones lineales	a4546=a6	-6,495	2,110	R
		MOL4344 y MOL1214	invierno-verano		b4546=b6	0,270	2,120	A
					a4344=a1214	4,043	2,086	R
					b4344=b1214	2,587	2,093	R
		E21 y E15	invierno-verano		a21=a15	4,958	2,262	R
					b21=b15	-1,508	2,306	A

Tabla 16 Resultados de las comparaciones de pendientes de la Hipótesis de Desarrollo (DET)

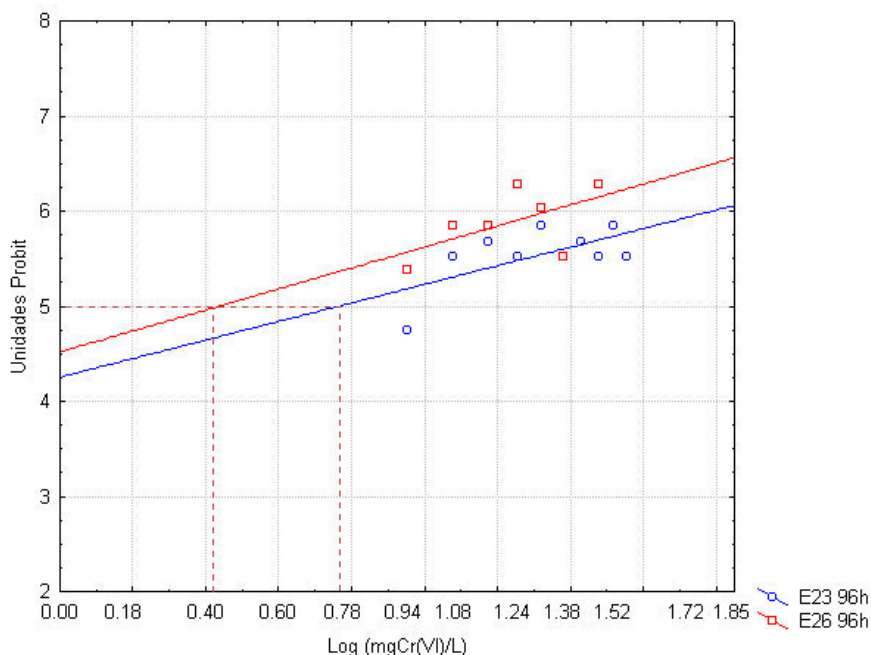
Hipótesis	Denominación	Curvas D-R	Diseño	Método	Prueba de hipótesis				
					Hipótesis nula	STD prueba	Valor crítico	Acept/Rech	
H _d , Pr _{4d} , H _{4e} , H _{4f}	Hipótesis de Desarrollo (DET)	E10 y E12	STD8-10, 16h vs STD25, 140h (etapa I)	comparación visual	LC50-E10=LC50-E12			R	
		E28 y E29	STD8-10, 16h vs STD25, 176h (etapa I)		LC50-E28=LC50-E29			R	
		E23 y E26	STD25, 158h vs STD28, 257h (etapa II)	comparación de regresiones lineales	a23=a26	-3,16	2,14	R	
					b23=b26	-0,16	2,16	A	
		E22 y E24	STD25, 158h vs STD27, 279h (etapa II)	prueba de “t” pareado	las medias son iguales	-2,65	2,20	R	
		E24, E25 y E26	STD27, 279h vs STD26, 277h vs STD25, 257h (etapa II)	comparación de regresiones lineales	a24=a25=a26	10,57	3,42	R	
					b24=b25=b26	0,79	3,47	A	
		E45 y E48	STD25, 159h vs STD27, 619h (etapa III)		a45=a48	-2,60	2,12	R	
					b45=b48	5,63	2,13	R	
		E21 y E27	STD25, 152h vs STD28, 800h (etapa III)		a21=a27	-2,87	2,11	R	
					b21=b27	4,40	2,12	R	
		E4 y E5	STD25, 144h vs STD30, 1320h (etapa IV)		a4=a5	1,82	2,57	A	
					b4=b5	-0,03	2,78	A	
		E25 y E27	STD26, 277h vs STD28, 800h (etapa V)	prueba de “t” pareado	las medias son iguales	-5,18	2,37	R	
				comparación de regresiones lineales	a25=a27	-6,51	2,12	R	
					b25=b27	-1,64	2,13	A	

ETAPA I: Los resultados de la comparación del efecto agudo entre E28 y E29, expresados como LC50, fueron para los embriones de STD 8-10, 16 h: >60 mg Cr(VI)/L, y para los renacuajos de STD 25, 176 h: 29,60 [27,46-31,94] mg Cr(VI)/L. El mismo comportamiento se ha reportado previamente para el caso de esta especie (Natale *et al.*, 2000) al comparar el efecto de la exposición aguda al Cr(VI) entre E10 y E12, detectando mortalidades más elevadas en las larvas expuestas que en los huevos o embriones, siendo sus LC50_{96h} de 19,36 [16,61-23,10] mg Cr(VI)/L.

ETAPA II: Incluye a las comparaciones que involucraron larvas de STD 25, 144 - 152 h de edad, respecto a larvas de una semana de vida, STD 27-28, 274 – 279 h de edad. Los resultados de la comparación (E23 y E26) provenientes de una misma puesta colectada de la población **PIL**, no muestran diferencias significativas ($p = 0,87$) entre las pendientes, lo que indica que en ambos momentos la puesta responde de la misma manera. Sin embargo la comparación entre las elevaciones arroja diferencias significativas ($p < 0,05$). En la Figura 22 se observa que ambas curvas son paralelas (misma respuesta) y que la curva del E26, se desplaza hacia la izquierda, lo que indica que las larvas del E26 (STD 25, 257 h) son significativamente más sensibles que las larvas expuestas en el E23 (STD 25, 158

h), siendo sus $LC50_{96h}$ de 6,0 y 11,6 mg Cr(VI)/L, respectivamente. Este experimento cumple con todos los principios de mínima variación establecidos.

Figura 22 Comparación de las curvas D-R de los ensayos 23 y 26



La comparación entre (E22-E24), provenientes de una misma puesta colectada de la población **ARR**, se realizó a través de una prueba de “**t**” **pareado**, cuyos resultados se presentan en la Tabla 16. Estos muestran que al umbral de significación de $\alpha = 0,05$ se puede rechazar la hipótesis nula de igualdad de las medias, por lo tanto existen diferencias significativas entre los dos ensayos, resultando las larvas expuestas en el E24 (STD 27, 279 h) significativamente más sensibles que las larvas expuestas en el E22 (STD 25, 158 h), siendo sus $LC50_{96h}$ <9 y 9,6 mg Cr(VI)/L respectivamente. Si bien este experimento cumple con los principios de mínima variación establecidos, es necesario señalar que el ensayo 22 fue un ensayo estático (ver más adelante), diseñado para contrastar diferencias metodológicas respecto al procedimiento semi-estático adoptado como estandarizado. Esta variación en la metodología, influiría disminuyendo la sensibilidad del E22 y minimizando las diferencias con la sensibilidad del E26 en favor de la hipótesis nula (no existen diferencias entre las curvas D-R), por lo que el resultado en favor del rechazo de esta hipótesis, nos permite sugerir la comparación como aceptable y despreciar la variación aportada por la metodología.

Los resultados del ensayo triple realizado para comparar la sensibilidad en la etapa II (E24-E25-E26) no pudieron ser comparados al tiempo establecido - 96h -, debido a que en los tres casos presentaron a partir de las 48 h una mortalidad igual o mayor al 75%, lo que impidió la realización o estimación de curvas D-R para las 96 h. Estos resultados nos obligaron a realizar una comparación de

curvas dosis-respuesta a las 24 horas. El resultado de éstas mostró que no existen diferencias significativas entre las pendientes ($p = 0,46$) y que sí existen diferencias significativas entre las ordenadas al origen ($p < 0,05$) (ver Figura 23). Las pruebas de ajuste a los modelos Probit y de regresión fueron negativas para todas ellas, por lo que la interpretación de estos resultados debe ser realizada con cierto cuidado. De todas maneras el resultado obtenido por triplicado a partir de este experimento, denota un claro aumento de la sensibilidad de las larvas de entre 250 y 280 días de edad (STD 26-28) respecto a las de estadios de 25 y 150 h de edad.

ETAPA III: Los resultados de la comparación (E45 y E48) provenientes de una misma puesta colectada de la población **FRI**, arrojan diferencias en cuanto a las pendientes y las ordenadas al origen ($p < 0,05$). En la Figura 24 de la página siguiente se observa que la curva del E48, se encuentra desplazada hacia la izquierda y posee una menor pendiente, lo que indica que las larvas del E48 (STD 27, 619 h) son significativamente más sensibles que las larvas expuestas en el E45 (STD 25, 159 h), siendo sus $LC_{50_{96h}}$ de 4,2 y 15,5 mg Cr(VI)/L, respectivamente. Este experimento cumple con todos los principios de mínima variación establecidos y corrobora el aumento de sensibilidad con el tiempo en períodos más prolongados que las comparaciones anteriores, 460 h ó 19 días. Esto indica un aumento significativo de la sensibilidad con el correr del tiempo de 3,7 veces, manteniéndose la misma tendencia que en las demás comparaciones realizadas hasta el momento.

Figura 23 Comparación de las curvas D-R de los ensayos 24, 25 y 26

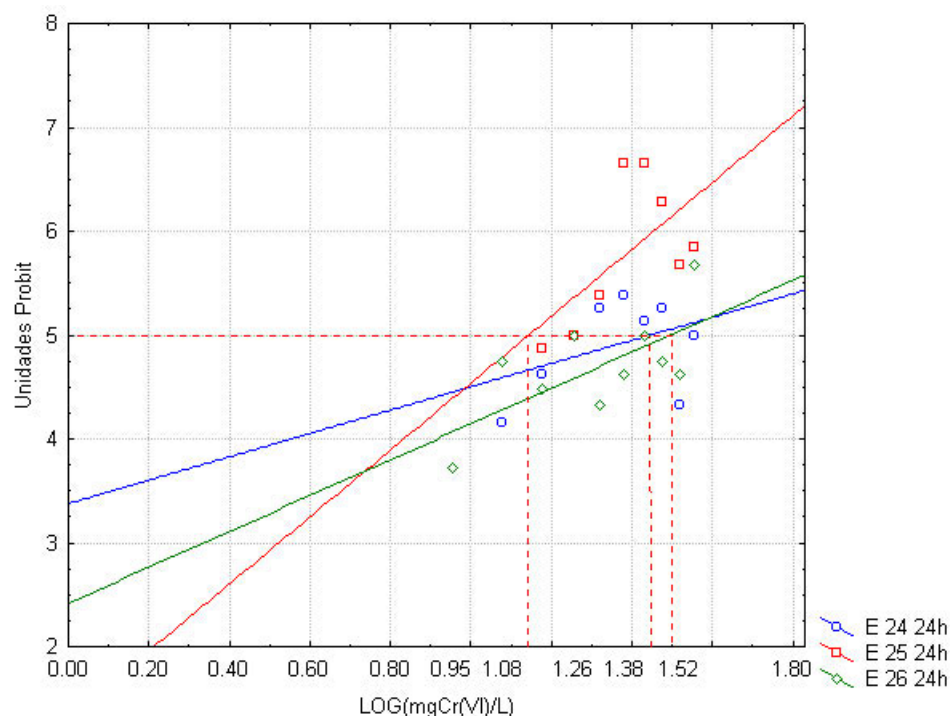
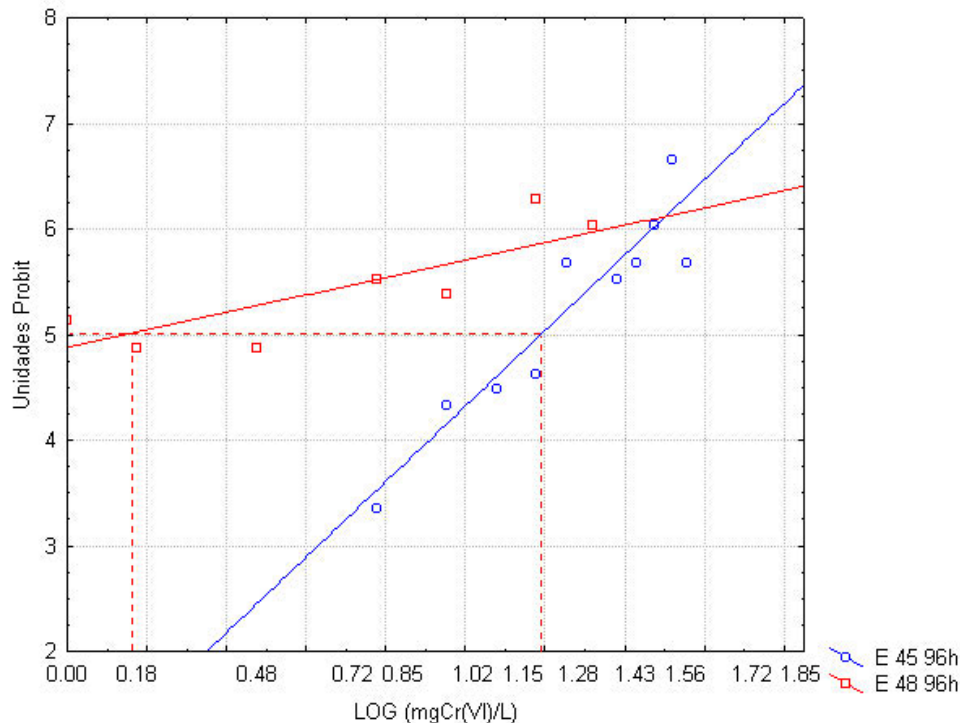
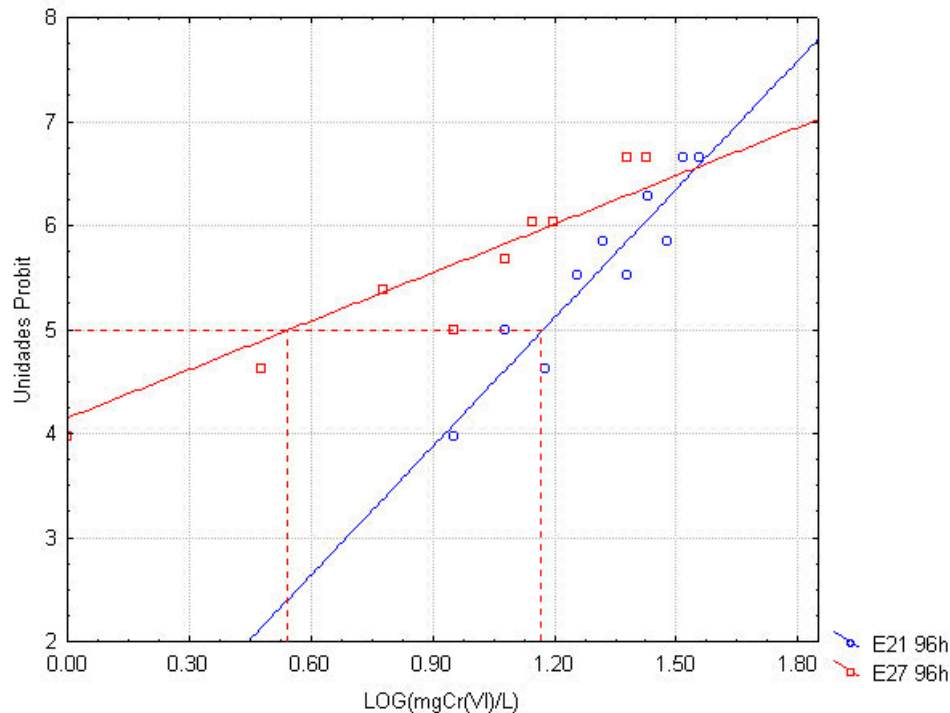


Figura 24 Comparación de las curvas D-R de los ensayos 45 y 48



Los resultados de la comparación entre (E21-E27) provenientes de una misma población **ARR**, arrojan diferencias en cuanto a las pendientes y las ordenadas al origen ($p < 0,05$), en la Figura 25 se observa que la curva del E27 se encuentra desplazada hacia la izquierda y posee una menor pendiente, lo que indica que las larvas del E27 (STD 28, 800 h) son significativamente más sensibles que las larvas expuestas en el E21 (STD 25, 152 h), siendo sus $LC_{50_{96h}}$ de 7,3 y 14,8 mg Cr(VI)/L, respectivamente. Esta comparación, si bien sólo cumple con el principio de simultaneidad de colección dentro de una misma población, muestra de manera confiable, la disminución de la sensibilidad asociada con el aumento de la edad y evidencia el desmejoramiento de los individuos mantenidos en laboratorio, si consideramos que en este ensayo comenzaron a aparecer muertes en los grupos control (dentro de los límites aceptables), lo que constituyó un hecho poco frecuente entre los bioensayos realizados con esta especie. Este experimento corrobora al igual que los anteriores el aumento de sensibilidad con el tiempo en períodos prolongados, 648 h ó 27 días, representado por una diferencia de 2 veces, continuando con la tendencia observada hasta el momento.

Figura 25 Comparación de las curvas D-R de los ensayos 21 y 27

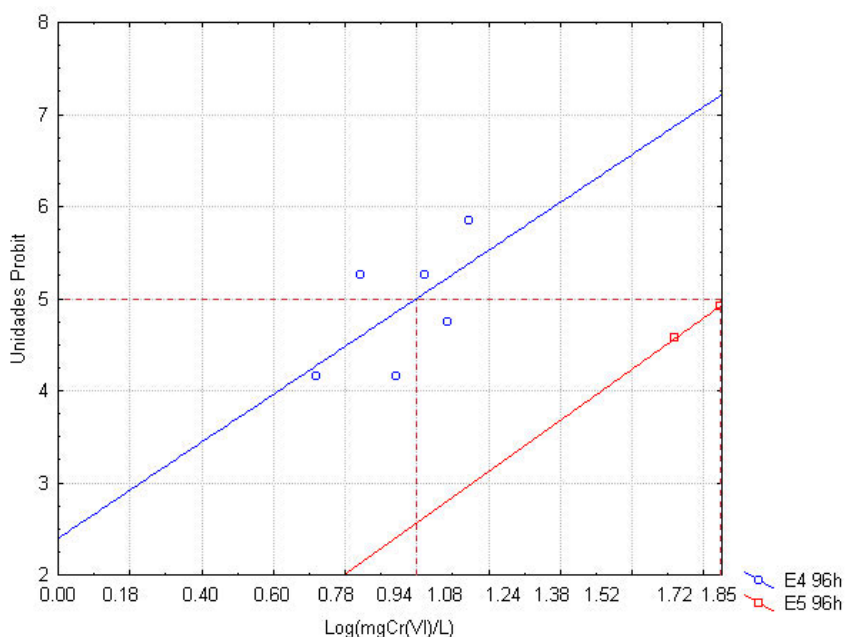


ETAPA IV: Los resultados de la comparación de las pendientes y las ordenadas al origen de (E4 y E5) no arrojan diferencias significativas entre estas dos curvas ($p = 0,08$ para **b** y $p = 0,56$ para **a**). Esto posee su justificación en el bajo número de observaciones utilizadas para la estimación de la curva (E5) y en la gran variabilidad que presenta la curva (E4); ninguna pasó los criterios de aceptación *a posteriori*. En la Figura 26 (página siguiente), donde se comparan ambas curvas, puede observarse que aparentemente poseen la misma respuesta, encontrándose distanciadas una respecto a la otra. Los mismos resultados se obtuvieron al efectuar la comparación con las curvas D-R para las 72 h; al examinar los resultados de las estimaciones de $LC50_{72h}$, vemos que en las larvas de mayor edad (STD 30, 1320 h) = 72,3 [64,8-80,4] mg Cr(VI)/L, y en las larvas del E4 (STD 25, 144h) = 9,9 [6,4-14,14] mg Cr(VI)/L. Si bien al interpretar las curvas estimadas y las $LC50$ calculadas para ambos grupos de edad, se deduce una pérdida de sensibilidad al tóxico con el aumento de la edad de los organismos (Natale *et al.*, 1998), los resultados obtenidos hasta el momento no permiten realizar distinciones en la sensibilidad de estos dos ensayos.

ETAPA V: La comparación (E25 y E27) efectuada con larvas de dos edades distintas provenientes de una misma puesta colectada de la población **ARR**, no pudo realizarse con las curvas D-R a las 96 hs, debido a la alta mortalidad mencionada anteriormente, que presentó la curva del E25. Como alternativa se realizó una prueba de “**t**” **pareado**, cuyos resultados indican que las larvas del E27 (STD 28, 800 h) son significativamente más resistentes que las larvas

expuestas en el E25 (STD 26, 277 h), ($p < 0,05$), siendo sus $LC50_{96h}$ de 7,3 y < 9 mg Cr(VI)/L, respectivamente. Los resultados de este experimento muestran una disminución de la sensibilidad de las larvas de mayor edad. Estos mismos resultados los corroboran ambos ensayos al evaluar la sensibilidad a las 24 h mediante la comparación de las curvas D-R (ver Tabla 2). Los resultados de esta comparación muestran que no existen diferencias significativas entre las pendientes ($p = 0,12$) y que sí presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las ordenadas al origen, lo que indica que el ensayo 27 posee menor sensibilidad. (ver Figura 27, página siguiente).

Figura 26 Comparación de las curvas D-R de los ensayos 4 y 5



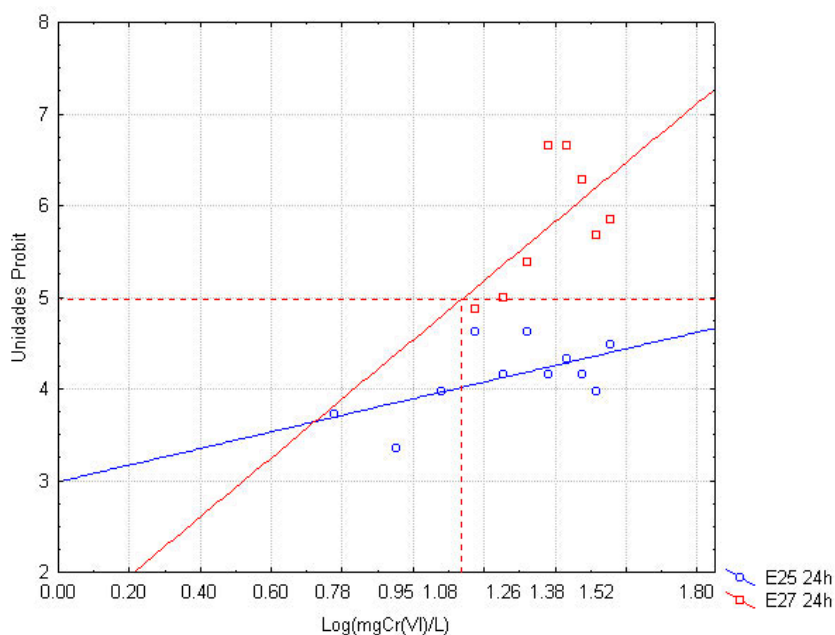
Finalmente, en relación con la hipótesis DET se realizaron pruebas ANOVA simples para verificar las distintas variables que representaron la Edad: horas, días y semanas, frente a las variables de respuesta consideradas: $LC50_{96h}$ y las pendientes y las ordenadas al origen de las curvas D-R. Los ANOVA realizados para todas estas combinaciones no arrojaron diferencias significativas (nivel de significancia 0,05) entre los grupos considerados. La interpretación de estos resultados podría asociarse a la ausencia de un diseño experimental robusto y balanceado para esta evaluación, ya que se utilizaron grupos con n elevados que contenían la variabilidad de los factores modificantes bióticos y abióticos en su totalidad y otros con n bajos, con $LC50$ obtenidas a partir de curvas D-R que no alcanzaban los criterios de aceptabilidad exigidos en este estudio.

Para realizar una descripción general de la variabilidad de respuesta en función de la edad, se realizó un análisis exploratorio de la variabilidad de las $LC50$, considerando las diferentes variables agrupadoras de tiempo (edad, expresada en horas, días y semanas). La selección de resultados se realizó primeramente mediante los criterios de selección establecidos y luego siguiendo los resultados

obtenidos a partir de la contrastación de las hipótesis poblacional y estacional. El resultado de esta segunda selección dejó fuera a la categoría de edad correspondiente a larvas de STD 27-28 y 274-279 h, ya que la mitad de las curvas D-R correspondientes a esta etapa del desarrollo no pudo ser estimada por falta de puntos (concentraciones) y la otra mitad no pasó los criterios de ajustes a los supuestos debido a su gran variabilidad. Finalizada esta selección, los datos utilizables no constituyeron el número de categorías esperadas para realizar la comparación de sensibilidades en función de las etapas de vida estudiadas. De todas maneras, se graficó la tendencia general de los datos dejando de lado la sensibilidad de los huevos y embriones (E10 y E28) y la sensibilidad de las larvas de estadios avanzados (E5) (Figura 28, página siguiente). Dado que esta figura representaría con todos las precauciones del caso (considerando los errores) la tendencia de la sensibilidad (expresada como $LC50_{96h}$) de las larvas de *H. pulchellus* en condiciones de laboratorio a lo largo de su desarrollo, se incorporan como puntos rellenos (ver Figura 28) los promedios de las $LC50_{96h}$ estimadas para las curvas de las categorías anteriormente descartadas¹¹.

La interpretación de esta figura indica que los renacuajos de *H. pulchellus* aumentan su sensibilidad a Cr(VI) progresivamente durante las primeras 400 horas de vida, llegando aproximadamente entre las 450 y 700 horas de vida a su etapa más sensible (**CLS**), para luego estabilizarse, y a partir de las 700 horas disminuir su sensibilidad conforme aumenta su edad, tamaño y desarrollo.

Figura 27 Comparación de las curvas D-R de los ensayos 25 y 27 a las 24 horas

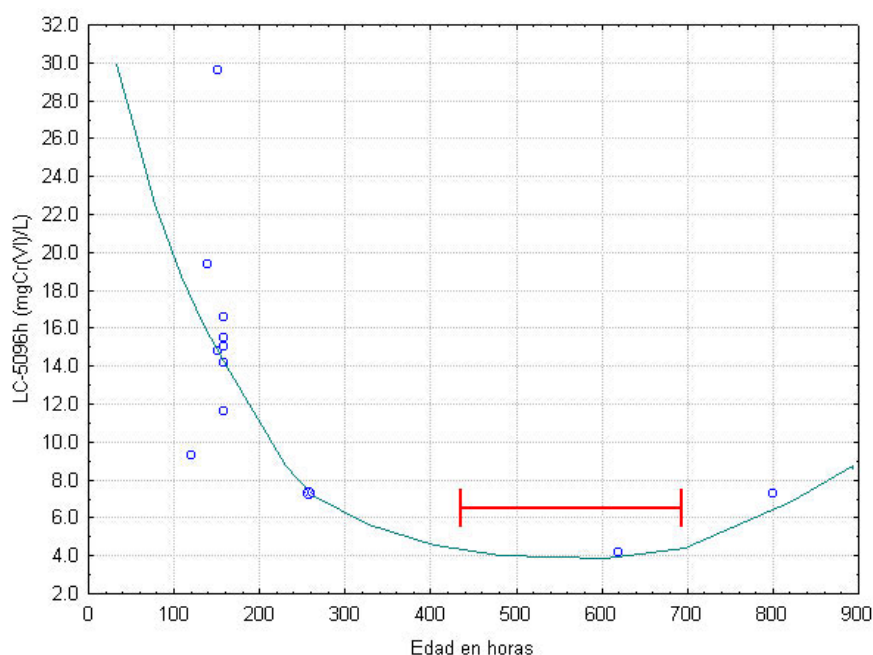


¹¹ Incurriendo en el error de incorporar al análisis estimaciones que fueron anteriormente descartadas por los criterios de aceptación establecidos (ver Tabla 5).

Los resultados obtenidos y hasta aquí interpretados acumulan evidencias a favor del rechazo de la hipótesis **H4d**: “Los renacuajos de *H. pulchellus* disminuyen su sensibilidad al cromo a medida que aumentan su estadio de desarrollo”, mostrando que la tendencia en principio no es lineal, como plantea la hipótesis, sino que presenta una forma de U, siendo por el contrario la tendencia general lineal más notoria, la inversa a la planteada por dicha hipótesis.

Respecto a la predicción asociada **Pr4d**: “En las larvas de *H. pulchellus* el estadio de vida crítico (CLS) es el estadio 25”, los resultados determinan una etapa crítica del desarrollo larval alrededor de las 600 h de edad, entre 450 y 700 (indicado con rojo en la Figura 28, edad que según estas estimaciones¹², comprenderían larvas de estadios entre 25 y 28).

Figura 28 Variabilidad de la sensibilidad en función del tiempo



Previo al desarrollo de las conclusiones, es importante mencionar que la variabilidad de las tasas de desarrollo de las larvas de *H. pulchellus* es muy grande, pudiendo permanecer según nuestros registros, en estadio 25 desde 120 hasta 1920 h de edad (80 días) y alcanzar el estadio 46 (fin de la metamorfosis) en un mes (720 h – 30 días). De ello se deduce que la predicción **Pr4d** estaría formulada de manera poco precisa, ya que según los resultados obtenidos, el STD 25 podría o no ser seleccionado como el estadio de vida crítico. Se sabe que esta predicción en un principio se formuló en referencia al STD 25 de 120-180 hs de edad o un STD 25 recién alcanzado (ver metodología propuesta). Por esta razón, en principio argumentaríamos en contra de la misma, debido a que el CLS a

¹² Estas estimaciones están basadas en las relaciones establecidas entre la edad, crecimiento y desarrollo (Estudios bioecológicos, Capítulo III)

proponer sería un STD 25 avanzado o un STD 27 (todos asociados con el intervalo de edad considerado entre 450 y 700 h de edad).

Si traemos a colación la deducción realizada en la metodología –“...la hipótesis del desarrollo general, que incluye a **H4d, Pr4d, H4e y H4f**, resulta para la metodología propuesta en el presente trabajo de tesis, indistinguible respecto a las hipótesis de desarrollo, edad y tamaño de las larvas...”, se entiende que las interpretaciones y conclusiones a las que se llegue por medio de la contrastación de estos diseños experimentales, se tendrá que hacer en referencia a la hipótesis conjunta Desarrollo, Edad, Tamaño (**DET**), por lo que resulta adecuado concluir que los resultados obtenidos y las interpretaciones realizadas aportan evidencia a favor de rechazar la hipótesis DET y las hipótesis involucradas (**H4d, Pr4d, H4e y H4f**), ya que las larvas de *H. pulchellus* aumentan su sensibilidad con el aumento de su edad, y consecuentemente con el aumento de su tamaño y su desarrollo (ver discusión).

A continuación se muestran los resultados obtenidos a partir de las contrastaciones simples de las hipótesis de procedimiento (factores modificadores abióticos).

Respecto a la **Hipótesis de Dureza**, los resultados de la comparación de E46 (agua de ensayo) y E47 (agua de ensayo diluida a la mitad con agua destilada) provenientes de una misma puesta colectada de la población **FRI**, arrojan que no existen diferencias significativas entre las pendientes ($p = 0,71$) y sí existen diferencias significativas ($p < 0,05$), entre las ordenadas al origen. En la Figura 29 se observa que ambas curvas muestran la misma pendiente, el patrón de respuesta de la puesta se mantiene y que la curva del E47 se encuentra desplazada hacia la izquierda. Esto indicaría que las larvas ensayadas con agua diluida (menor dureza) son significativamente más sensibles que el grupo de larvas ensayadas en condiciones normales, siendo sus $LC_{50_{96h}}$ de 6,0 y 15,1 mg Cr(VI)/L, respectivamente. Dicho de otro modo, la disminución en la dureza aumenta la sensibilidad de las larvas expuestas en un factor de 2,5 veces. Este experimento cumple con todos los principios de mínima variación establecidos y aporta fundamentos en favor de la hipótesis **H4g**: “La dureza del agua afecta de manera inversamente proporcional a la sensibilidad de las larvas de *H. pulchellus*”.

Respecto a las **Hipótesis de Procedimiento FETAX**, los resultados de la comparación de E43 (agua FETAX) y E44 (agua de ensayo), provenientes de una misma puesta colectada de la población **MOL**, arrojan que no existen diferencias significativas entre las pendientes ($p = 0,20$), ni entre las ordenadas al origen ($p = 0,87$). En la Figura 30 de la página siguiente, se observa que las respuestas son similares, principalmente en las LC_{50} , ya que se cruzan en el punto medio (Probit 5 = 50% de mortalidad) y sus $LC_{50_{96h}}$ son 14,4 y 14,5 mg Cr(VI)/L, respectivamente. Esto indicaría que los ensayos realizados con el agua FETAX como agua de ensayo, no poseen efectos sobre la sensibilidad de larvas de *H. pulchellus* respecto al Cr(VI) realizados con la metodología propuesta. Este experimento cumple con todos los principios de mínima variación establecidos y

aporta fundamentos en favor de la hipótesis: **H4h:** "El agua utilizada en los ensayos propuestos no presenta diferencias significativas con el agua propuesta en los ensayos FETAX, respecto a su influencia sobre la sensibilidad al cromo de la especie estudiada".

Figura 29 Comparación de las curvas D-R de los ensayos 46 y 47

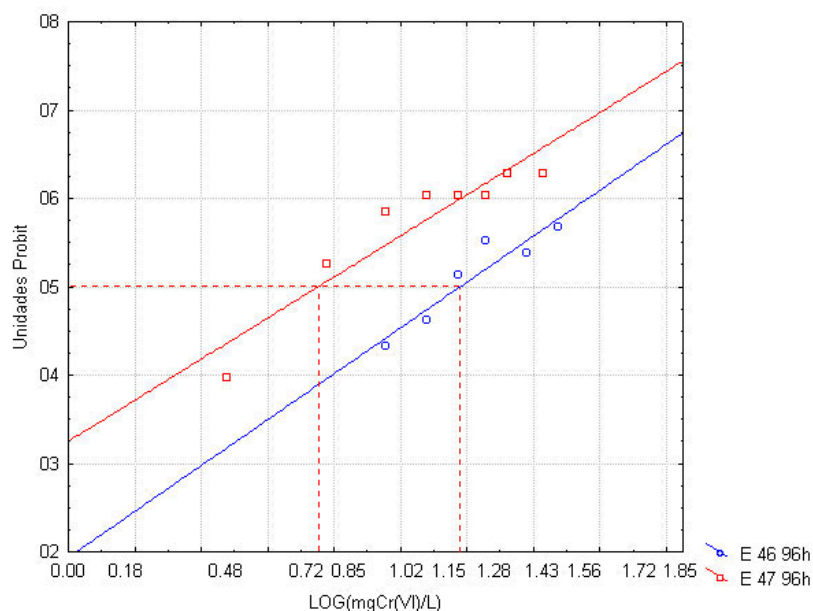
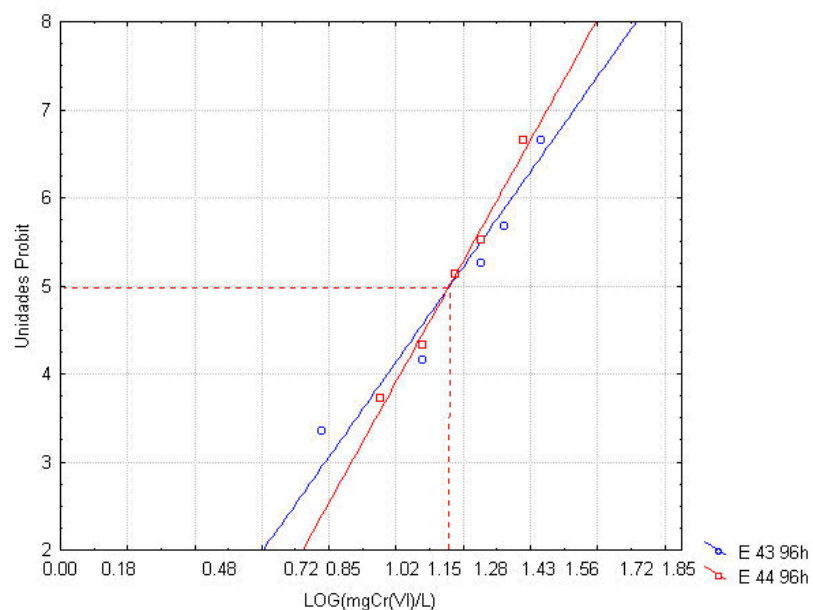


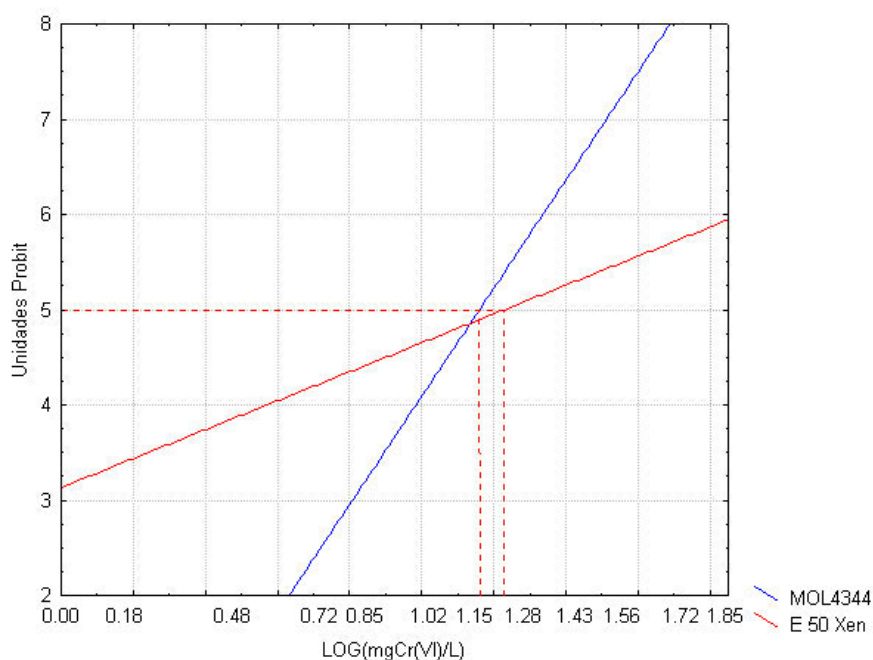
Figura 30 Comparación de las curvas D-R de los ensayos 43 y 44



Por otra parte, los resultados de la comparación con ensayos estandarizados entre la especie propuesta por FETAX *X. laevis* (E50) e *H. pulchellus* (MOL4344) no

muestran diferencias significativas ($p = 0,83$) entre las ordenadas al origen y sí presentan diferencias significativas entre las pendientes ($p < 0,05$). En la Figura 31 se observa que ambas curvas poseen respuestas diferentes y se cruzan en el punto medio (Probit 5 = 50% de mortalidad), indicando que sus $LC50_{96h}$ son similares: 14,47 y 16,56 mg Cr(VI)/L para *H. pulchellus* y *X. laevis*, respectivamente. Este experimento cumple con todos los principios de mínima variación establecidos y permite concluir que *H. pulchellus* posee una sensibilidad significativamente menor que *X. laevis*. Los resultados obtenidos brindan argumentos a favor del rechazo de la hipótesis de procedimiento FETAX: **H4i**: “La sensibilidad al cromo de las larvas de *H. pulchellus* no difiere significativamente de la de las larvas de *X. laevis*, organismo prueba de los protocolos estandarizados FETAX” (ver discusión).

Figura 31 Comparación de las curvas D-R de los ensayos *Xenopus laevis* vs. *Hypsiboas pulchellus*

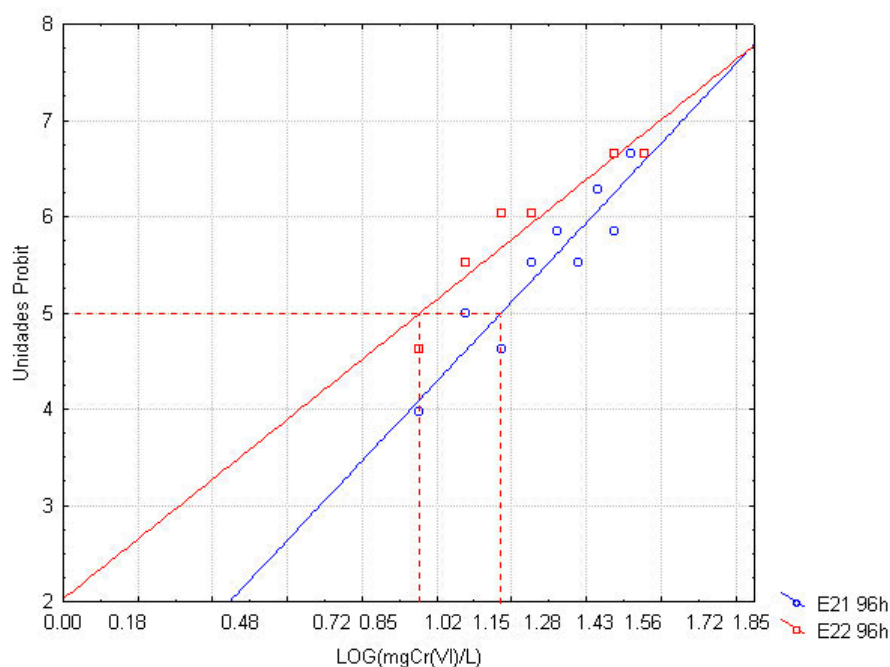


Respecto a la **Hipótesis de Estaticidad**, los resultados de la comparación E21 (ensayo semi-estático) y E22 (ensayo estático), ambos provenientes de diferentes charcas de la población **ARR**, efectuados con larvas de STD 25 y 150 h de edad, no muestran diferencias significativas ($p = 0,22$) entre las pendientes, lo que indica que ambas puestas respondieron de la misma manera. Sin embargo, la comparación entre las elevaciones arroja diferencias significativas ($p < 0,05$). En la Figura 32 (página siguiente) se observa que ambas curvas presentan una respuesta similar y que la curva del E22 se desplaza hacia la izquierda en su parte inferior, lo que indica que las larvas del E22 (estático) son significativamente más sensibles a las concentraciones menores de cromo que las larvas expuestas en la E21 (semiestático), siendo sus $LC50_{96h}$ de 9,7 y 14,8 mg Cr(VI)/L, respectiva-

mente. Este ensayo cumple con los principios de simultaneidad de colecta y realización de ensayo, habiéndose realizado con puestas de dos charcas diferentes. Esto indica que el procedimiento de recambio de medio favorecería el estado de los organismos de prueba, y que la falta de recambio aumenta la mortalidad. Los resultados obtenidos brindan argumentos a favor del rechazo de la hipótesis de procedimiento **H4j**: "El procedimiento de renovación diaria de medio de ensayo (semi-estático), no presenta diferencias significativas con el procedimiento de no recambio de medio (estático), respecto a su influencia sobre la sensibilidad al cromo de la especie estudiada".

Respecto a las exposiciones crónicas, los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados se presentan por separado. En el caso del experimento 1, se muestran a continuación los resultados de efectos letales (agudos y crónicos) y efectos subletales (crónicos).

Figura 32 Comparación de las curvas D-R de Estaticidad

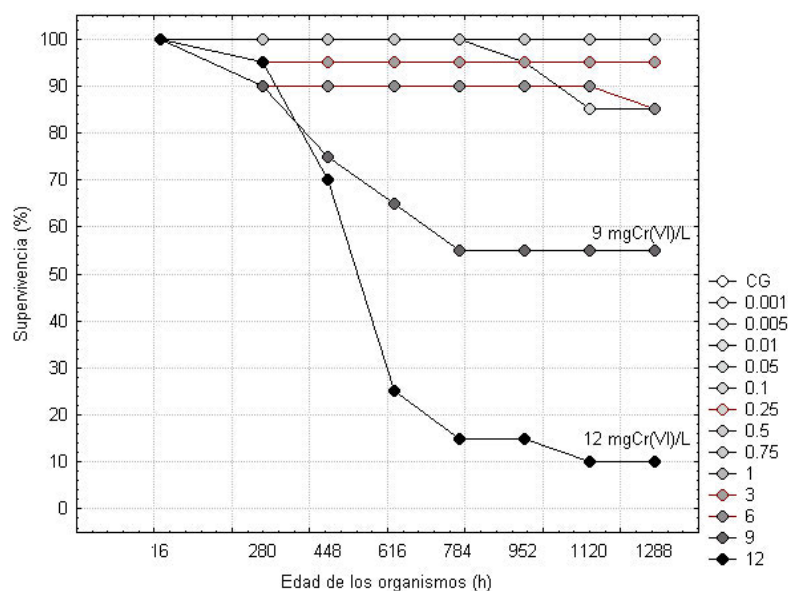


Efectos letales: los resultados de los ensayos agudos realizados como punto de comparación de los dos grupos de edad expuestos (embriones y larvas) fueron presentados en la Tabla 5, junto con los demás resultados de los ensayos agudos (LC50_{96h}). Los mismos mostraron luego de 96 h de exposición para los embriones (STD 8-10, 16 h) LC50 superiores a 60 mg Cr(VI)/L, y para los renacuajos (STD25,176 h) LC50 de 29,60 [27,46-31,94] mg Cr(VI)/L. El tiempo letal medio (TL50) para 12 mg de Cr(VI)/L para los embriones y larvas fue de 535 h y 330 h, respectivamente. Ello indica que los individuos expuestos desde huevos resultaron según estos dos parámetros (LC50 y TL50), dos veces más resistentes que los expuestos desde larvas (STD 25).

El análisis realizado con los datos obtenidos de los efectos letales crónicos, expresados como supervivencia a lo largo de todo el experimento (ANCOVA), muestra incidencia de los dos factores estudiados (concentraciones y grupo de edad) sobre la supervivencia ($p < 0,001$) y la interacción entre ambos ($p < 0,001$) cuando se consideran como covariables el tiempo de exposición y la edad de los organismos. La supervivencia del grupo de edad renacuajos fue más baja que la del grupo de edad embriones ($p < 0,001$). La comparación entre las concentraciones durante el tiempo de exposición mostró diferencias significativas para las concentraciones de 1; 6; 9 y 12 mg Cr(VI)/L, respecto de los grupos control, al considerar esta variable.

Las comparaciones realizadas mediante ANOVA para cada tiempo de medición, muestran que el grupo de edad de los renacuajos presentó mortalidades significativamente más elevadas que el grupo de edad de los embriones ($p < 0,05$) durante el intervalo de tiempo de exposición de 264-768 h. Luego de ello, no se observaron diferencias de mortalidad entre los grupos. Las curvas de supervivencia promedio para diferentes concentraciones del tóxico en ambos grupos de edad pueden verse en las Figuras 33 y 34, que indican que el grupo de edad de los renacuajos es mucho más sensible que el de embriones. En ambos grupos hay una mayor mortalidad luego de los primeros días de exposición (entre 400 y 780 h de edad), que se observan en las concentraciones de Cr(VI) entre 6, 9 y 12 mg/L en el primer grupo, evidenciándose un comportamiento de respuesta más gradual en el grupo de embriones (concentraciones de Cr(VI) de 9 y 12 mg/L) (ver discusión).

Figura 33 Curva de supervivencia promedio de grupo de edad embrionario



En las Figuras 35 y 36, de las páginas siguiente y subsiguiente, respectivamente, pueden verse las estimaciones de los resultados de NOEC y LOEC en función del tiempo determinadas mediante ANOVA y la prueba de Dunnett en cada grupo de edad para el efecto del factor (Concentración de Cr(VI)) sobre la supervivencia. Los dos puntos finales establecidos siguen la misma tendencia, con una mayor sensibilidad para las larvas.

Figura 34 Curva de supervivencia promedio de grupo de edad larval

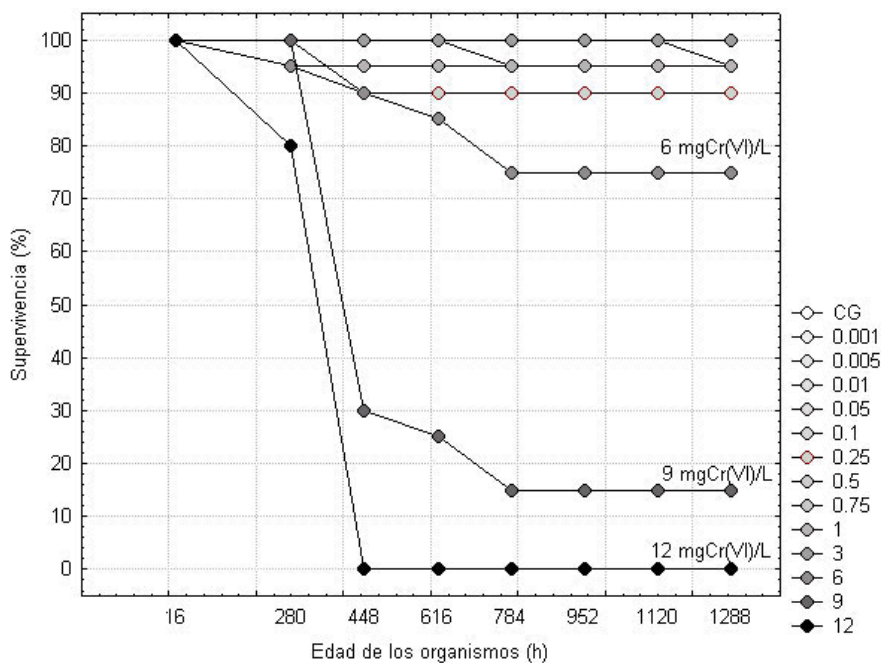
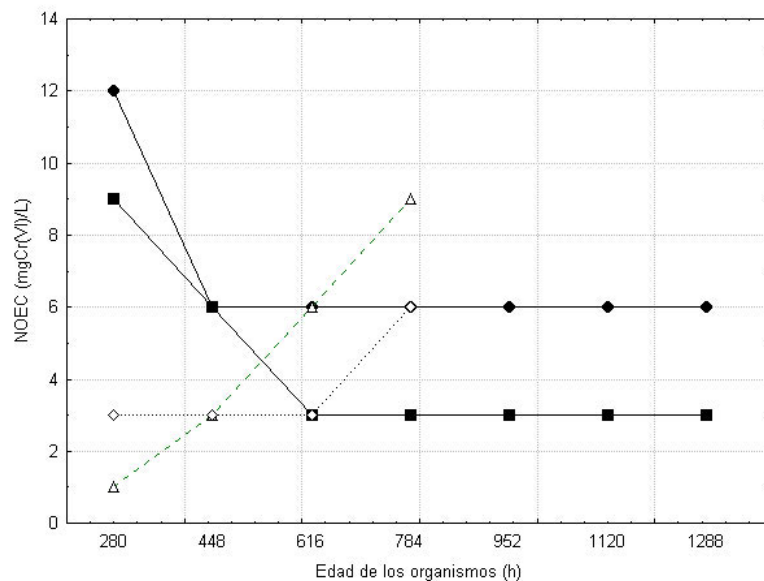
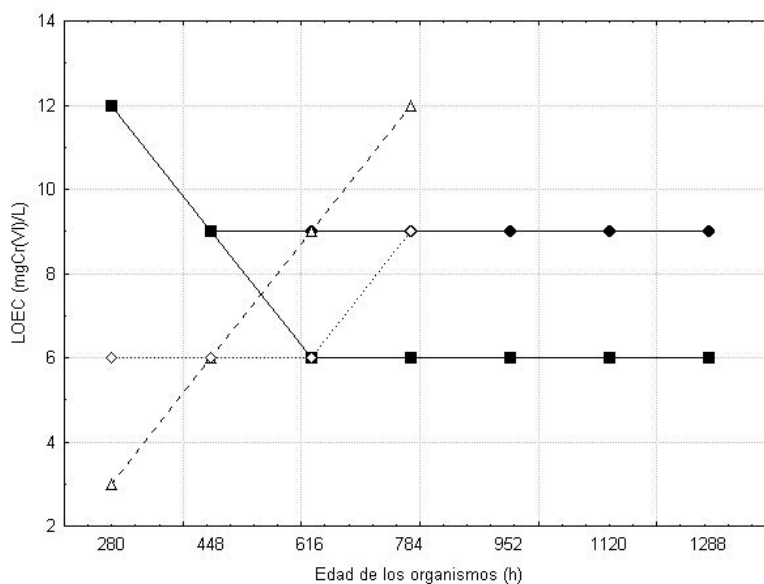


Figura 35 Resultados de las estimaciones NOEC en tiempo, usando ANOVA y la prueba de Dunnett en cada grupo de edad, para el efecto del Cr(VI) sobre la supervivencia y el crecimiento de *Hypsiboas pulchellus*



Referencias: Círculo: supervivencia del grupo de edad embrionario; Cuadrado: supervivencia del grupo de edad larval; Triángulo: inhibición del crecimiento en el grupo de edad embrionario; Rombo: inhibición del crecimiento en el grupo de edad larval.

Figura 36 Resultados de las estimaciones LOEC en tiempo, usando ANOVA y la prueba de Dunnett en cada grupo de edad, para el efecto del Cr(VI) sobre la supervivencia y el crecimiento de *Hypsiboas pulchellus*

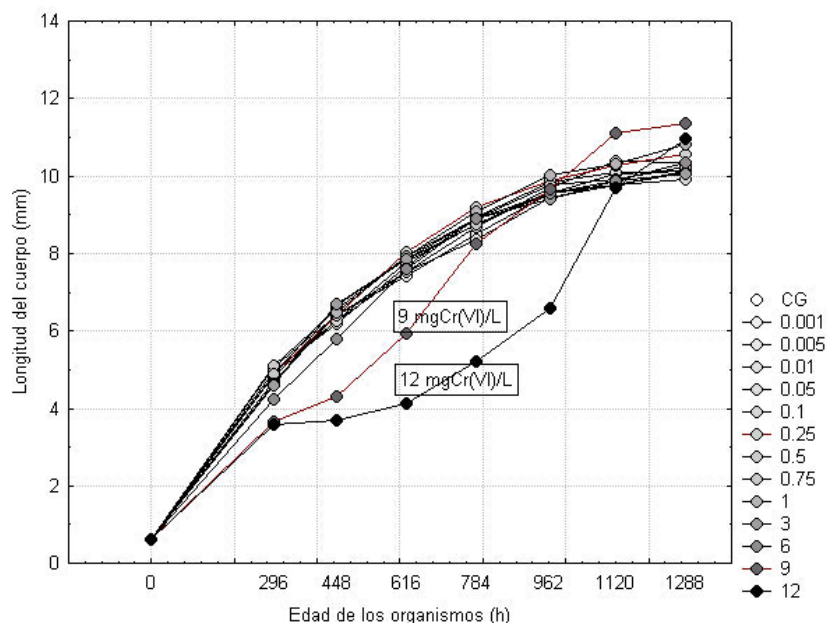


Referencias: Círculo: supervivencia del grupo de edad embrionario; Cuadrado: supervivencia del grupo de edad larval; Triángulo: inhibición del crecimiento en el grupo de edad embrionario; Rombo: inhibición del crecimiento en el grupo de edad larval.

Efectos subletales: Los resultados del ANCOVA realizado con los datos obtenidos de los efectos subletales crónicos, muestran el efecto de los dos factores estudiados (concentraciones y grupo de edad) sobre el crecimiento ($p < 0,001$) y que no hay interacción entre ellos. Teniendo en cuenta el factor grupo de edad, los resultados indican que los embriones tuvieron un crecimiento significativamente mayor y fueron menos afectados que las larvas. La inhibición del crecimiento pudo detectarse en 6 y 9 mg Cr(VI)/L para los grupos de edad de larvas y embriones respectivamente. (ver Figuras 35a y 53b) Los resultados de los ANOVA de dos factores indican que los organismos expuestos desde el estadio embrionario tuvieron un crecimiento significativamente mayor que aquellos expuestos a partir del estadio larval ($p < 0,001$), para los organismos de 280 a 784 h de edad. Luego de esa edad, no se detectaron diferencias significativas en el crecimiento. El efecto del Cr(VI) en el crecimiento entre experimentos para cada grupo de edad de acuerdo con el ANOVA de una vía y las correspondientes pruebas de Dunnett se muestra en las Figuras 35 y 36, donde se grafican resultados de los NOEC y LOEC calculados para la inhibición del crecimiento a lo largo de todo el experimento. Los resultados muestran que a medida que el tiempo de exposición aumenta (como así la edad de los organismos), son necesarias mayores concentraciones del tóxico para producir un efecto en el crecimiento de los individuos resistentes que se adaptaron a esta condición, lo que ocurre aparentemente hasta las 784 h. Se observó una inhibición del crecimiento para individuos de 280 h y hasta 784 h en las cuatro concentraciones más elevadas probadas. Luego, las mediciones efectuadas a las 952 h de edad, no mostraron inhibiciones y luego de 1120 h sólo la más alta concentración de 9,0 mg de Cr(VI) produjo una exaltación del crecimiento respecto a los controles para el grupo de edad de los renacuajos. En las Figuras 37 y 38 (página siguiente) se puede observar este comportamiento y el incremento de la tasa de crecimiento luego de una exposición de 448 h para ambos grupos con las mayores concentraciones de Cr(VI) que inicialmente produjeron una inhibición del crecimiento.

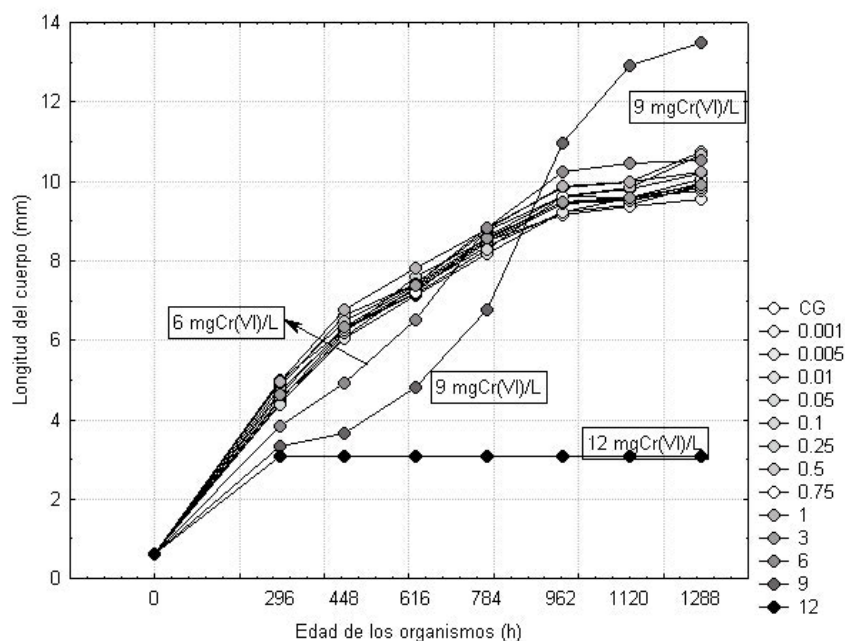
Al considerar las variables de respuesta medidas al momento de la primera metamorfosis, vemos que los resultados del ANOVA de dos factores no mostraron diferencias significativas en el peso respecto del factor grupo de edad ($p = 0,71$), sí mostraron diferencias significativas para el factor concentración de Cr(VI) ($p < 0,001$) y no evidenciaron interacción ($p = 0,02$). Con respecto a esta variable, el ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett mostraron diferencias significativas relativas a los controles ($p < 0,005$), evidenciando mayores pesos en los organismos expuestos a concentraciones de 6,0 y 9,0 mg Cr(VI)/L. El efecto de la exposición en el estadio de desarrollo no mostró diferencias significativas con respecto a cualquiera de los dos factores analizados con las pruebas no paramétricas de Friedman ($p = 0,33$) y Kruskal-Wallis ($p = 0,22$) para el grupo de edad embrionario y ($p = 0,15$) para el larval.

Figura 37 Curvas de crecimiento de *Hypsiboas pulchellus* (longitud del cuerpo en mm) durante el tiempo de exposición para los grupos de edad embriones



Referencias: las concentraciones de Cr(VI) están en mg/L. CG: grupo de control. Se muestran concentraciones significativamente diferentes a las del grupo de control.

Figura 38 Curvas de crecimiento de *Hypsiboas pulchellus* (longitud del cuerpo en mm) durante el tiempo de exposición para los grupos de edad larvas



Referencias: las concentraciones de Cr(VI) están en mg/L. CG: grupo de control. Se muestran concentraciones significativamente diferentes a las del grupo de control.

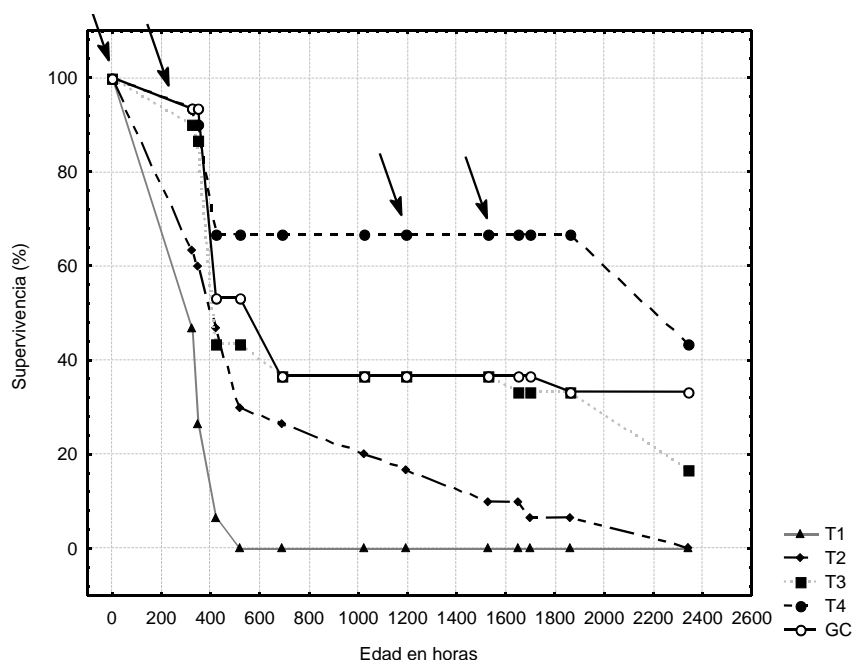
Los resultados de las exposiciones crónicas obtenidas a partir del experimento 2 se resumen en la Tabla 17 y se muestran en las Figuras 39 (Curvas de supervivencia (SUP), 40 (Curvas de crecimiento para (LCU)); 41 (Curvas de crecimiento para (P)), y 42 (Curvas de desarrollo (DS)), de las páginas siguientes.

Tabla 17 Resultado de las exposiciones crónicas

Prueba de significancia	Variable dependiente	21/05/04 (686h)	11/06/04 (1190h)	22/06/04 (1454h)	09/07/04 (1862h)	Total
ANCOVA	SUP					<0,0001
ANCOVA	LCU					<0,0001
ANCOVA	P					<0,0001
ANOVA	LCU	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0015	
ANOVA	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,1805	
ANOVA	LHC					0,6651
ANOVA	PM					0,5794
ANOVA	LPL					0,2952
Kruskal-Wallis	STD	<0,0001	0,0002	0,0059	0,0434	

Como se observa en las curvas de supervivencia realizadas Figura 39, página siguiente, los individuos expuestos desde huevos T1 mostraron una mortalidad abrupta y temprana alcanzando el 100% en un corto plazo. Los individuos del grupo T2 denotan un aumento de mortalidad respecto a los grupos no expuestos, que coincide con el inicio de su exposición, y aumenta de manera gradual hasta alcanzar el 100% al final del experimento. El resto de los tratamientos T3 y T4, no presenta influencia sobre la mortalidad de los grupos expuestos.

Figura 39 Curvas de supervivencia (SUP)



Referencia para ambas figuras: Las flechas indican los cuatro momentos distintos de exposición. T1: estadio 9 (17h de edad); T2: estadio 25 (182h de edad); T3: estadio 37 (1190h de edad) y T4: estadio 41 (1526h de edad)

Figura 40 Curvas de crecimiento para (LCU)

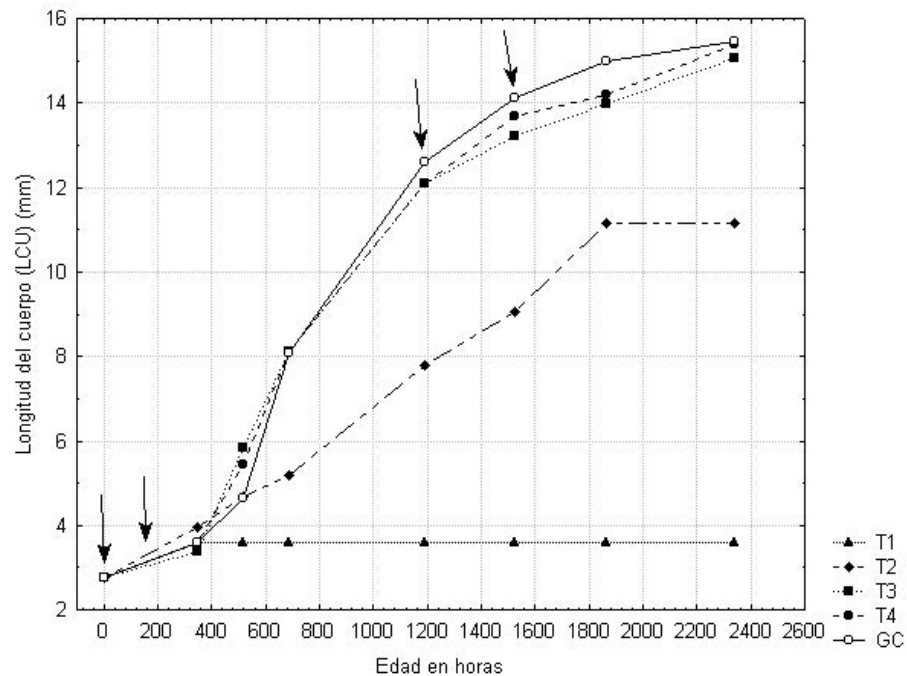
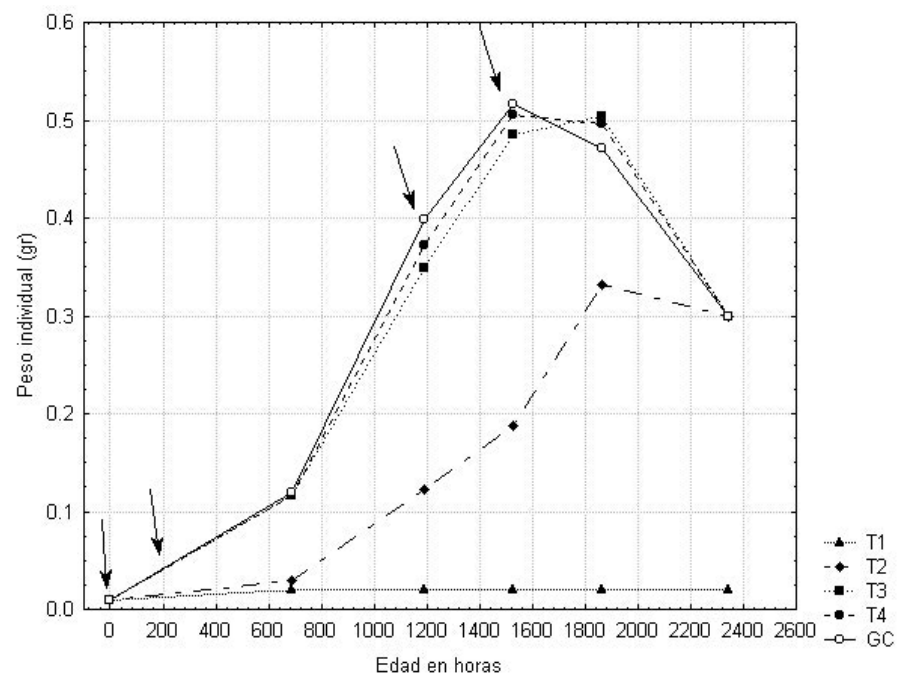


Figura 41 Curvas de crecimiento para (P)



Referencia: Las flechas indican los cuatro momentos distintos de exposición. T1: estadio 9 (17h de edad); T2: estadio 25 (182h de edad); T3: estadio 37 (1190h de edad) y T4: estadio 41 (1526h de edad)

Respecto al análisis del crecimiento, los resultados muestran diferencias significativas entre los tratamientos a lo largo de toda la experiencia, siendo solo el grupo T2 el que se diferencia significativamente del resto ($p < 0,001$). Este grupo incrementa su tasa de crecimiento a partir de las 1454 h de edad y hacia el final de la experiencia, llegando en el caso del peso a no presentar diferencias significativas con el resto de los grupos el día de la última medición a las 1862 h de edad.

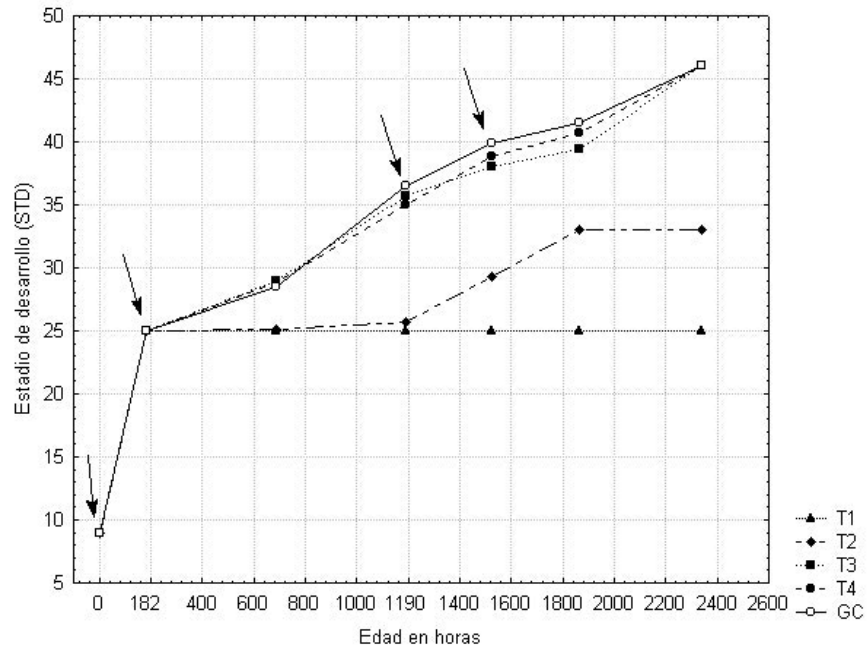
Al analizar la variable desarrollo, se observa el mismo comportamiento presentado por el peso. Los individuos del tratamiento T2, que mostraron inicialmente una disminución en la tasa de desarrollo (asociada con el comienzo de la exposición), luego de las 1190 h de edad aumentan su tasa de desarrollo hasta no manifestar diferencias con el resto de los grupos el día de la última medición a las 1862 h de edad.

Al evaluar la supervivencia en los mismos tiempos de exposición, se observa que la sensibilidad de los renacuajos disminuye gradualmente, conforme se desarrollan. Si consideramos el efecto de los tratamientos aplicados sobre la supervivencia, a lo largo de la experiencia, concluimos que T1 fue el tratamiento más nocivo seguido en orden decreciente por T2, T3 y T4. Además de que, como se observa en la Figura 39, entre las 422 y las 618 h de edad todos los grupos (inclusive el grupo control) sufrieron una notable mortalidad (ver discusión).

Los resultados permiten concluir que los renacuajos de *H. pulchellus* expuestos a concentraciones subletales de Cr(VI) fueron afectados en distinto grado según el momento de su exposición. Los individuos expuestos desde estadio 9 (T1) y que presentaron un 100% de mortalidad a las 494 h de exposición, no vieron afectada su tasa de desarrollo, al menos hasta el momento de su eclosión. Su tasa de crecimiento en cambio mostró indicios de inhibición.

Los individuos expuestos desde estadio 25 (T2) sufrieron una inhibición temprana del crecimiento y desarrollo, acompañada por un aumento en la mortalidad, modificando este comportamiento hacia el final de la experiencia, con un incremento en las tasas de crecimiento y desarrollo. Contrariamente, los grupos expuestos desde los estadios 37 y 41 (T3 y T4 respectivamente) no se vieron afectados de manera significativa por la exposición al tóxico. Y si bien se pudo justificar su menor sensibilidad al evaluar las supervivencias, los resultados no permiten hacer una interpretación acerca de su posible plasticidad en esta etapa del desarrollo.

Figura 42 Curvas de desarrollo (DS)



Referencia: Las flechas indican los cuatro momentos distintos de exposición. T1: estadio 9 (17h de edad); T2: estadio 25 (182h de edad); T3: estadio 37 (1190h de edad) y T4: estadio 41 (1526h de edad)

CAPÍTULO V

Evaluación de la sensibilidad de las distintas especies estudiadas mediante bioensayos de toxicidad aguda, utilizando Cr(VI) como tóxico patrón de referencia

1 INTRODUCCIÓN

Tanto en el Capítulo I como en la introducción del Capítulo IV se discernió sobre la necesidad de contar con metodologías de diagnóstico, ya sea en evaluaciones de riesgo ambiental o en la determinación de la calidad del agua. Se fundamentó la importancia de los bioensayos como herramienta bioanalítica (ítem 1.1 del Capítulo IV), se realizaron distintas consideraciones acerca de los bioensayos agudos de toxicidad, sus usos y su precisión (ítem 1.2 del Capítulo IV), mencionándose las distintas propuestas de ensayos estandarizados por parte de organismos internacionales. Se discutió sobre la necesidad de generar protocolos con especies autóctonas (ítem 1.3 del Capítulo IV) y se profundizó sobre el estudio de sensibilidad en los anuros (ítem 1.4 del Capítulo IV). En ese último ítem se introdujeron distintos aspectos de la biología y fisiología de los anuros, involucrados en la respuesta frente a los contaminantes. Se mencionó el origen de la información actual acerca de la biología, fisiología, anatomía y otras consideraciones generales de los anuros, que sirvieron de base para los estudios realizados en el área de la toxicología acuática. Finalmente se describió el estado y el grado de avance del conocimiento en esta área temática en nuestro país.

En este contexto se fundamentó la necesidad de contar con estudios ecotoxicológicos que empleen el mayor número de especies posibles, que contemplen escenarios de exposición realistas respecto al problema de contaminación planteado, y que estén acompañados de metodologías que permitan la comparación de la sensibilidad de las diferentes especies utilizadas. En el transcurso del Capítulo IV se evaluó la sensibilidad de huevos, embriones y larvas de *Hypsiboas pulchellus* al Cr(VI) bajo diferentes condiciones de ensayo, en exposiciones agudas y crónicas. Se analizó la variabilidad en la respuesta de esta especie a lo largo de toda su vida debida a los diferentes factores modificantes bióticos y abióticos que sobre ella actúan, se fijaron los procedimientos metodológicos asociados al diseño, ejecución, análisis e interpretación de los bioensayos efectuados en este trabajo. Debido a ello, en esta introducción se dejarán de lado las cuestiones ya abordadas en el capítulo anterior, y se profundizará directamente sobre los efectos del cromo como contaminante ambiental, su distribución en el ambiente y su efecto sobre ecosistemas acuáticos

1.2 Efectos del cromo

Cuando se intentó hallar en la literatura información sobre posibles mecanismos de acción a nivel bioquímico y molecular causantes de las disfunciones fisiológicas que conducen a los efectos letales agudos del Cr(VI), no se encontró una explicación certera, ampliamente aceptada, acerca de los posibles mecanismos causantes de estos efectos. Como mencionamos en la introducción, se conoce que el cromo hexavalente es la más tóxica de las dos formas que se encuentran disponibles en los sistemas acuáticos, en relación quizá a una mayor biodisponibilidad y reactividad. Por un lado esta toxicidad se debe a que el Cr(VI) posee una alta solubilidad y en medio acuoso se encuentra no en forma de catión, sino formando oxianiones (ej. CrO_4^{2-} , HCrO_4^- , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) que son isoestructurales con el sulfato y el fosfato, pudiendo ingresar fácilmente a la célula a través de los canales aniónicos de sulfatos o fosfatos. Por otro lado el Cr(VI) es un fuerte agente oxidante que intracelularmente sufre rápidamente una serie de reducciones, pasando por especies intermediarias como Cr(V), Cr(IV) con la generación de radicales libres, para finalmente alcanzar la forma más estable, el Cr(III) (Carriquiriborde, 2004).

1.2.a Efectos sobre animales

Existe evidencia suficiente para afirmar que el cromo hexavalente es cancerígeno en animales experimentales, habiéndose además reportado que causa varias formas de daño genético en ensayos de mutagenicidad durante cortos períodos de exposición, incluido el daño al ADN (IPCS, WHO, 1988). Los efectos genotóxicos, mutagénicos y daños en el ADN, debido a la toxicidad del Cr(VI) han sido ampliamente estudiados en los últimos años (Sugiyama *et al.*, 1986; Zhitkovich *et al.*, 1995; Gayatri *et al.*, 1997; Stearns, 2000; Zhitkovich *et al.*, 2001; Quievryn *et al.*, 2002). La información proveniente de los ensayos realizados con Cromo (VI) indica efectos en una gran variedad de organismos (microorganismos, hongos, plantas y animales). Muchos microorganismos (protozoos, hongos, algas y bacterias) son capaces de incorporar cromo. En general, la sensibilidad de estos organismos está en el rango de 0,05 – 5 mg cromo/kg de medio. En el caso de las plantas, se conoce que todas las especies estudiadas acumulan cromo en sus tejidos. Las altas concentraciones de cromo producen intoxicación y clorosis, similar a la que se da en los casos de deficiencia de hierro, mientras que se obtiene mortalidad, al tratarlas con 30 a 50mg de cromo por litro durante tres días (IPCS, WHO, 1988).

Muchos estudios han sido realizados con organismos acuáticos invertebrados (poliquetos, cladoceros, crustáceos, larvas de diferentes insectos), los que generalmente presentan mayor sensibilidad que las especies de vertebrados acuáticos ensayadas (peces y larvas de anuros). La concentración de cromo letal para muchos de los invertebrados acuáticos estudiados fue de 0,05 mg/L (US NAS/NAE, 1972) (IPCS, WHO, 1988). En la Tabla 1 se muestran valores de sensibilidad para distintas especies al Cr(VI) y Cr(III) según Eisler, (1986).

Tabla 1 Toxicidades agudas de cromo hexa y trivalente en la vida acuática (Eisler, 1986)

Compuestos químicos, ecosistema, grupo taxonómico, organismo, y otra información	Toxicidad aguda			
	Concentración (µg/L)	% de mortalidad	Duración de la prueba ^a	Referencia ^b
Cromo hexavalente				
Agua dulce				
Plantas	2.500-25.000	50	96 h	1
Rotíferos				
<i>Philodena acuticornis</i>				
Dureza del agua, en mg CaCO ₃ /L				
25	3.100	50	96 h	2
81	15.000	50	96 h	2
Moluscos				
<i>Physa heterostrophia</i>				
Dureza del agua, en mg CaCO ₃ /L				
45	17.300	50	96 h	3
171	31.600-40.600	50	96 h	3
Crustáceos				
<i>Gammarus pseudo-limnaeus</i>	67.000	50	96 h	3
<i>Machrobrachium lamarrei</i>	1.840	50	96 h	4
<i>Daphnia magna</i>	435	50	24 h	5
Peces				
<i>Bolephthalmus dussumieri</i>	30.500	50	96 h	6
<i>Salmo gairdneri</i>				
Peso 0,2 g				
pH del agua 7,8	12.200	50	96 h	7
pH del agua 7,0	7.600	50	96 h	7
pH del agua 6,5	3.400	50	96 h	7
Peso 25 g				
pH del agua 7,8	65.500	50	96 h	7
pH del agua 7,0	45.000	50	96 h	7
pH del agua 6,5	20.200	50	96 h	7
Peces				
2 especies	17.600-118.000	50	96 h	8
3 especies				
Agua blanda	<18.000	50	96 h	9
Agua dura	>133.000	50	96 h	9
<i>Oncorhynchus</i> sp.	200	53	12 s	9
<i>Carassius auratus</i>	110.000	50	96 h	10
Dureza del agua, en mg CaCO ₃ /L				
20	37.500	50	96 h	3
220	>90.000	50	96 h	3
<i>Lepomis macrochirus</i>				
Dureza del agua, en mg CaCO ₃ /L				
20	118.000	50	96 h	3
44	113.000	50	96 h	3
45	110.000-170.000	50	96 h	3
120	213.000	50	96 h	3

Compuestos químicos, ecosistema, grupo taxonómico, organismo, y otra información	Toxicidad aguda			
	Concentración (µg/L)	% de mortalidad	Duración de la prueba ^a	Referencia ^b
171	130.000-135.000	50	96 h	3
360	133.000	50	96 h	3
<i>Morone saxatilis</i>	30.400	50	96 h	3
Agua salada				
Moluscos				
3 especies	14.000-105.000	50	96 h	3
Anélidos				
Poliquetos				
<i>Neanthes arenaceodentata</i>	550	50	28 d	11
<i>Neanthes arenaceodentata</i>	200	50	56 d	11
<i>Nereis virens</i>	1.000	50	21 d	11
<i>Capitella capitata</i>	280	50	28 d	11
<i>Capitella capitata</i>	5.000	50	96 h	11
4 especies	2.000-7.500	50	96 h	3
Equinodermos				
<i>Asterias forbesi</i>	32.000	50	96 h	3
Crustáceos				
7 especies	2.000-98.000	50	96 h	3
<i>Tisbe holothuriae</i>	8.100	50	48 h	12
<i>Acartia clausi</i>	8.830-19.270	50	48 h	13
<i>Callinectes sapidus</i>				
Estadios de vida tempranos	930	50	96 h	14
Estadios de vida tempranos	320	50	40 d	14
Peces				
<i>Atherinosoma</i>	36.000	50	96 h	8
<i>microstoma</i>	19.300	0	168 h	8
<i>Aldrichetta</i>	24.000	50	96 h	8
<i>forsteri</i>	17.900	0	96 h	8
<i>Menidia menidia</i>				
Larva	12.400-14.300	50	96 h	3
Juvenil	20.100	50	96 h	3
<i>Fundulus heteroclitus</i>	91.000	50	96 h	3
<i>Citharichthys stigmatheus</i>	30.000-31.000	50	96 h	3
Cromo trivalente				
Agua dulce				
Moluscos				
<i>Amnicola</i> sp.	8.400	50	96 h	3
Anélidos				
<i>Nais</i> sp.	9.300	50	96 h	3
Artrópodos				
<i>Daphnia magna</i>				
Dureza del agua, en mg CaCO ₃ /L				
48	2.000	50	96 h	3
52	16.800	50	96 h	3
99	27.400	50	96 h	3
110	26.300	50	96 h	3
195	51.400	50	96 h	3
215	58.700	50	96 h	3

Compuestos químicos, ecosistema, grupo taxonómico, organismo, y otra información	Toxicidad aguda			
	Concentración (µg/L)	% de mortalidad	Duración de la prueba ^a	Referencia ^b
<i>Gammarus</i> sp.	3.200	50	96 h	3
Insectos, 4 especies	2.000-64.000	50	96 h	3
Peces				
9 especies	3.300-71.900	50	96 h	3
3 especies				
Agua blanda	<3.000	50	96 h	9
Agua dura	72.000	50	96 h	9
<i>Oncorhynchus</i> sp	200	0	12 s	9
<i>Salmo gairdneri</i>				
Juveniles	4.400	50	96 h	15
Huevos	495	100	30 d	15
<i>Pimephales promelas</i>				
Dureza del agua, en mg CaCO ₃ /L				
20	5.070	50	96 h	3
203	7.000-29.000	50	96 h	3
360	67.400	50	96 h	3
Agua salada				
Moluscos				
<i>Crassostrea virginica</i>	10.300	50	96 h	3
Anélidos				
<i>Neanthes arenaceodentata</i>	12.500	0	21 d	11
Crustáceos				
<i>Sesarma haematocheir</i> , zoea	56.000	50	96 h	3
<i>Acartia clausi</i>	17.000	0	48 h	13
Peces				
<i>Aldrichetta forsteri</i>	53.000	50	96 h	8
2 especies	3.300-7.500	50	96 h	8

^aAbreviaturas: h = hora; d = día; s = semana

^bReferencias: 1, Mangi *et al.* 1978; 2, Buikema *et al.* 1974; 3, EPA 1980; 4, Murti *et al.* 1983; 5, Jouany *et al.* 1982; 6, Krishnaja y Rege 1982; 7, Van der Putte 1981b; 8, Negelski 1976; 9, Steven, *et al.* 1976; 10, Riva *et al.* 1981; 11, Reish 1977; 12, Moraitou-Apostolopoulou y Verriopoulos 1982a; 13, Moraitou-Apostolopoulou y Verriopoulos 1982b; 14, Bookhout *et al.* 1984; 15, Stevens y Chapman 1984.

A pesar de poseer gran cantidad de información en cuanto a la sensibilidad de diferentes especies de organismos acuáticos, incluidas larvas de anuros, al cromo hexavalente, los aspectos relacionados con la toxicocinética, la toxicodinámica, el modo de acción y los daños fisiológicos que este metal ocasiona sobre las larvas de anuros no han sido difundidos en la literatura científica al iniciar la presente investigación.

1.2.b Efectos y distribución en el ambiente

Los niveles normales de cromo en el ambiente son bajos y no representan riesgos para la salud humana. Como mencionamos en la introducción, los niveles

normales en las aguas de los ríos de diferentes partes del mundo oscilan entre 1 y 10 µg/litro, y las aguas de los océanos contienen menos de 1 µg/L. Sin embargo, existen lugares donde las concentraciones aumentan y han llegado a ser peligrosas, incluso para la salud humana. Un estudio presentado por Morton y Elwood (1974), muestra correlaciones entre las concentraciones de cromo en agua para consumo humano y la frecuencia de malformaciones en el sistema nervioso de las poblaciones humanas que consumen ese agua.

El nivel aceptado para el consumo y para el agua potable es de 0,05 mg/L, (Ley 11.820 Provincia de Buenos Aires y Código Alimentario Argentino), mientras que el nivel guía de calidad de agua para la protección de vida acuática para agua dulce superficial es de 0,002 mg/L (concentración máxima permitida establecida en Anexos del Decreto Reglamentario a la Ley Nacional de Residuos Peligrosos 24051).

En varios estudios realizados en América Latina se ha observado que los niveles de cromo en sedimentos de zonas costeras aumentan en relación a zonas urbano industriales, con concentraciones de hasta 795 µg/g de peso seco de sedimento (Seeliger *et al.*, 1988). No existe en nuestro país legislación referente a niveles guía de calidad de sedimentos para la protección de la vida acuática, por lo cual se han tomado valores guía de una reglamentación de Canadá (*Interim Freshwater Sediment Quality Guidelines, ISQG*), la que define como referencia de calidad 37,3 mg/kg de peso seco de sedimento y nivel de posibles efectos (*Probable Effect Levels PEL*) a una concentración de 90 mg/kg (CCME, 2001).

Se han publicado para el Río Paraná niveles de cromo promedio en sedimentos (µg/g de peso seco) de 85 (entre 73 y 96), en el río de la Plata de 83,7 (33-192), en arroyos costeros tributarios del Río de la Plata de hasta 86,2; y para el caso extremo del Riachuelo (sitio muy contaminado), de 2046 µg/g, manteniéndose los niveles del arroyo “el Pescado” en 17,5 (8,25-29,35) a lo largo de toda su extensión (Kreimer *et al.*, 1996; Bilos *et al.*, 1998; Villar *et al.*, 1998, 1999; Ronco *et al.*, 2001). En estos mismos estudios se informan valores de cromo para el agua subsuperficial expresados como promedio en mg/L de 19,7 (15-27) para el Río Paraná, de 44,2 (10-102) para el Río de la Plata, manteniéndose los niveles del arroyo “el Pescado” en el sector que comprende nuestro sistema de estudio y las charcas seleccionadas (A y B) por debajo de 0,01 mg/L (para más detalle ver tabla de propiedades fisicoquímicas Capítulo III).

Los valores encontrados de cromo para los distintos compartimentos en distintas partes del mundo, incluidos datos del río Paraná, el Río de la Plata y el Arroyo “El Pescado”, se muestran en la Tabla 2, página siguiente. Los datos aquí presentados de manera general no muestran una correlación lineal significativa ($p=0,72$) entre la concentración de cromo en sedimentos y la concentración en el agua.

Tabla 2 Valores de cromo encontrados para distintos compartimentos en distintas partes del mundo, incluidos datos del río Paraná, Río de la Plata y arroyo El Pescado

País	Muestra	[Cr]	Intervalo [Cr]	Referencia
Bulgaria, sector de llanura	Fuentes de provisión de agua	-	7 - 8	Novakova <i>et al.</i> , 1974
Bulgaria, distrito montañoso	Fuentes de provisión de agua	-	60 - 215	Novakova <i>et al.</i> , 1974
Canada, Grandes Lagos	Fuentes de provisión de agua	1	0,2 - 19	Weilwe y Chawla 1969, Durum y Haffty, 1963; Merrit, 1971
Canada, Río Ottawa	Fuentes de provisión de agua	0,01		Weilwe y Chawla, 1969; Durum y Haffty 1963; Merrit 1971
China, Río Amarillo	Fuentes de provisión de agua	-	-	Cehn Bingheng personal communication, 1986
China, distrito Tia-Ding	Fuentes de provisión de agua	-	0 - 80	Cehn Bingheng personal communication, 1986
Alemania, Río Rin	Fuentes de provisión de agua	18		DeGroot y Allersma, 1973
Poland, Wisla	Fuentes de provisión de agua	-	31 - 112	Pasternak, 1973
USA, Río Illinois	Fuentes de provisión de agua	21	5 - 38	Mathis y Cummings, 1973
USA, Lago Tahoe	Fuentes de provisión de agua	< 0,07		Bond <i>et al.</i> , 1973
USA, Río Mississippi	Fuentes de provisión de agua		3 - 20	Bond <i>et al.</i> , 1973
USA, área New York, curso contaminado	Fuentes de provisión de agua	1250		Lieber <i>et al.</i> , 1964
Argentina Río de la Plata	Sedimentos	86,2		Ronco <i>et al.</i> , 2001,
Argentina, Riachuelo	Sedimentos	2046		Kreimer <i>et al.</i> , 1996.
Argentina Río de la Plata	MPS	203-408		Bilos <i>et al.</i> , 1998.
Argentina Río de la Plata	Sedimentos	21 y 27		Bilos <i>et al.</i> , 1998.
Argentina, Arroyo el Gato	Sedimento	32,735	7,5 – 86,25	Ronco <i>et al.</i> , 2001
Argentina, Arroyo el Pescado	Sedimento	17,5	8,25 – 29,35	Ronco <i>et al.</i> , 2001
Argentina, Arroyo Carnaval Martín	Sedimento	13,85	1 – 50,5	Ronco <i>et al.</i> , 2001
Argentina, Río Paraná	Agua subsuperficial	8,75	2 - 19	Villar <i>et al.</i> , 1999
Argentina, planicie de inundación Río de la Plata	Agua subsuperficial	5	3 - 15	Villar <i>et al.</i> , 1999
Argentina, humedal costero Río de la Plata	Agua subsuperficial	13,25	4 - 24	Villar <i>et al.</i> , 1999
Argentina, Río Paraná	Sedimento	40,75	22 - 56	Villar <i>et al.</i> , 1999
Argentina, humedal planicie de inundación Río de la Plata	Sedimento	54,25	38 - 78	Villar <i>et al.</i> , 1999
Argentina, humedal Río de la Plata	Sedimento	80,75	60 - 99	Villar <i>et al.</i> , 1999
Argentina, Río Paraná, Santa Fé	Agua subsuperficial	27	18 - 36	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río Paraná, Rosario	Agua subsuperficial	18	14 - 22	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río Paraná, Brazo Largo	Agua subsuperficial	15	10 – 20	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río Paraná, Otamendi	Agua subsuperficial	19	13 - 25	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, San Isidro	Agua subsuperficial	65	13 – 117	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, Santo Domingo	Agua subsuperficial	102	59 – 145	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, Quilmes	Agua subsuperficial	54	30 – 78	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, Ezpeleta	Agua subsuperficial	49	29 - 70	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, Hudson	Agua subsuperficial	10		Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, Punta Lara	Agua subsuperficial	15	9 – 21	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, Berisso.	Agua subsuperficial	29	17 – 41	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, Punta Blanca.	Agua subsuperficial	30	12 - 48	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río Paraná, Santa Fé	Sedimento	73	57 – 89	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río Paraná, Rosario	Sedimento	96	76 – 116	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río Paraná, Brazo Largo	Sedimento	83	65 – 101	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río Paraná, Otamendi	Sedimento	88	61 – 115	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, San Isidro	Sedimento	192	108 - 276	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, Santo Domingo	Sedimento	107		Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, Quilmes	Sedimento	62	46 - 78	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, Ezpeleta	Sedimento	67	68 – 69	Villar <i>et al.</i> , 1998

Sitio	Muestra	Tipo	Intervalo [Cr]	Referencia
Argentina, Río de la Plata, Hudson	Sedimento	33	31 – 35	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, Punta Lara	Sedimento	51	46 – 56	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, Berisso.	Sedimento	68		Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río de la Plata, Punta Blanca.	Sedimento	90	75 - 105	Villar <i>et al.</i> , 1998
Argentina, Río Reconquista	Agua subsuperficial	51	6 -105	de la Torre <i>et al.</i> , 2001
Argentina, Río Reconquista	Agua subsuperficial	35	2 – 300	Tolpaín <i>et al.</i> , 1999
Argentina, Arroyo el Pescado	Agua subsuperficial	< 5		Presente trabajo de tesis
Argentina, charcas sitio de estudio	Agua subsuperficial	< 5		Presente trabajo de tesis
	Corteza terrestre	Tierra	100-300 *	Ecological Analysis, 1981
	Suelos	Tierra	5-300 *	Towill <i>et al.</i> , 1978
	Granito y limo	Tierra	10 *	Towill <i>et al.</i> , 1978
	Áreas control	Tierra	50-54 *	Giblin <i>et al.</i> , 1980
	Mat. Suspendido Particulado	Agua	≤460 *	Turekian y Scott, 1967
California	Sedimentos	Agua	90-140 *	Towill <i>et al.</i> , 1978
Wisconsin	Sedimentos	Agua	1-49 *	Towill <i>et al.</i> , 1978
Alemania, Rhine River	Sedimentos	Agua	Max. 1.240	Towill <i>et al.</i> , 1978
Brasil	Sedimentos	Agua	24.820	Pfeiffer <i>et al.</i> , 1980
	Agua de ríos y lagos	Agua	1-10	Langard y Norseth, 1979
	Aguas costeras	Agua	3 - 20	Towill <i>et al.</i> , 1978
	Agua potable	Agua	Usualmente <8; raramente >50	Towill <i>et al.</i> , 1978
	Efluentes industriales no tratados		≤5.000.000	Steven <i>et al.</i> , 1976
	Niveles basales	Aire	0,001	Steven <i>et al.</i> , 1976
	Áreas urbanas	Aire	0,006	Steven <i>et al.</i> , 1976
	Áreas rurales	Aire	0,01	Langard y Norseth 1979

Las concentraciones de muestras de tierras fueron expresadas en mg/kg.

Las concentraciones de muestras de agua fueron expresadas en mg/kg (material suspendido particulado y sedimentos) y en µ/L (aguas de río y laguna, aguas costeras, agua potable y efluentes industriales no tratados).

Las concentraciones de muestras de aire fueron expresadas en µ/m³.

Las concentraciones de muestras de sedimentos están expresadas en µ/g de peso seco.

Como mencionamos en la introducción, el cromo es ubicuo en la naturaleza, presentando niveles aceptables para la salud humana y la protección de la vida acuática en sitios no contaminados. Sin embargo, si nos basamos en la gran cantidad de estudios realizados, encontramos que los niveles de cromo en suelo, aire, agua y biota son elevados en los alrededores de zonas industriales, asociados con tratamiento electrolítico de metales, plantas de tratamiento municipales, curtiembres, perforaciones de petróleo, torres de enfriamiento. El cromo hexavalente ingresa al ciclo biogeoquímico del cromo por la industria formando parte de los desechos vertidos directamente en cuerpos de agua o a los distintos compartimentos, teniendo como destino final los cuerpos de agua y sus sedimentos. La toxicidad del cromo hexavalente es la de mayor actividad biológica de las especies de cromo y aún hoy se conoce muy poco sobre las propiedades de los compuestos organometálicos. La toxicidad del cromo en aguas superficiales depende de factores tales como el potencial redox, el pH, la presencia de sustancias complejantes y de material particulado. El cromo es un elemento esencial en humanos y en algunas especies de animales, aunque esta información es incompleta para diversos grupos de organismos, siendo por otra parte mutagénico, teratogénico y carcinogénico.

Según Eisler (1986), una vez que el cromo llega a los ecosistemas acuáticos no se biomagnifica a través de las cadenas tróficas y permanece en altas concen-

traciones en los eslabones más bajos de las cadenas alimentarias. Sus propiedades tóxicas a niveles subletales son modificadas por una gran variedad de factores bióticos y abióticos. La sensibilidad al cromo varía ampliamente incluso entre especies cercanamente relacionadas. De toda la información existente, las especies más sensibles de agua dulce, mostraron efectos adversos a concentraciones de 0,01 mgCr(VI)/L en agua. En tejidos, niveles superiores a 4 mgCr total/kg de peso seco estaría indicando contaminación por cromo. Algunos valores encontrados en tejidos de distintos organismos se muestran en la Tabla 3 (páginas siguientes).

1.3 Clasificación de especies

Si retomamos el marco teórico expuesto en el Capítulo I junto con la justificación de la investigación propuestos (Ítem 3 del Capítulo I), examinamos la introducción desarrollada en el capítulo precedente y en el presente hasta este punto, vemos que es de suma importancia efectuar una clasificación de sensibilidad de distintas especies estudiadas respecto a un contaminante elegido como referencia. Este capítulo tiene entre sus objetivos generar una clasificación de las distintas especies que habitan el área de estudio, respecto a un contaminante elegido como tóxico patrón de referencia: el cromo.

Consideramos que el desarrollo de este objetivo, si bien no constituye una tarea de investigación creativa¹, cubre un hueco de información que como hemos venido justificando, urge para seguir avanzando en la investigación de un modo científicamente más riguroso y creativo, haciendo investigación propiamente dicha. Por otra parte se pretende que esta clasificación sea el producto de la aplicación de una metodología consolidada, que permita la comparación, mediante pruebas estadísticas, de las sensibilidades ofrecidas por las distintas especies al tóxico, además de posibilitar efectuar comparaciones entre las posibles fuentes de variación que se presentan dentro de los experimentos (como parte del error experimental), entre experimentos, y con metodologías de la literatura científica. De esta manera, se genera una nueva base de información, que permite abordar la discusión acerca del posible empleo de anuros como indicadores o centinelas de la contaminación, además de contar con mayor información sobre su posible sensibilidad y susceptibilidad a los distintos agentes contaminantes o de estrés químico.

¹ Se refiere a que el hecho de emplear una misma metodología con diferentes especies, es una tarea reiterativa y rutinaria, más que una serie de pasos sucesivos que avanzan hacia un objetivo novedoso.

Tabla 3 Concentración de cromo en tejidos, provenientes de colectas a campo de especies seleccionadas de flora y fauna de agua dulce y terrestres

Ecosistema, grupo taxonómico, organismo, tejido, localización y otras variables	Concentración (ppm)	Referencia ^a
DE AGUA DULCE		
Moluscos		
Caracoles, 8-9 km por debajo de desechos de una planta de electrochapeado		
Partes blandas	450,0 PS	40
Anfibios		
Anuros, Laurel, Maryland		
Renacuajos		
Todo, 2 especies	1,6-3,8 PF	41
Adultos		
Todo, 3 especies	1,8-5,4 PF	41
<i>Rana pipiens</i>		
Todo	0,5 PF	41
Peces		
<i>Alosa pseudoharengus</i>		
Todo	1,1 PF	42
<i>Lepomis gibbosus</i>		
Todo, Laurel, Maryland	5,7 PF	41
<i>Salvelinus namaycush</i>		
Lago Cayuga, Nueva York		
Todo		
Edades 1-10 años	<0,013 PF	43
Edad 11	0,032 PF	43
Edad 12	0,09 PF	43
<i>Umbra pygmaea</i>		
Todo, Laurel, Maryland	0,9 PF	41
Peces		
Músculo, 12 especies	0,03-1,1 PF	44
TERRESTRES		
Plantas		
<i>Artemisia tridentata</i>		
Todo, Idaho		
Distancia de una planta de fosfatos		
3 km viento a favor	270,0-400,0 PS	45
3 km viento en contra	77,0-117,0 PS	45
<i>Festuca arundinacea</i>		
Distancia viento a favor de desechos de torres enfriadoras		
15 metros	342,0 PS	46
130 metros	15,0 PS	46
Áreas de control	0,6 PS	46

Ecosistema, grupo taxonómico, organismo, tejido, localización y otras variables	Concentración (ppm)	Referencia ^a
<i>Nicotiana tabacum</i>		
Kentucky		
Hoja de burley	2,5 PS	47
Hoja de cigarrillo	0,3-6,5 PS	47
Hoja de pipa	2,8 PS	47
Hoja de cigarro	3,1-6,2 PS	47
<i>Secale cereale</i>		
Estados Unidos		
Semilla	0,05 PF	48
Total	0,04 PF	48
Ontario, Canada, en suelo mejorado con lodos cloacales		
General	2,2-3,3 PS	49
<i>Zea mays</i>		
Semilla	0,25 PS	44
Meollo	0,02 PF	44
Aceite	0,47 PF	44
Comida	0,06-0,13 PS	44
Grano	0,1 PS; 3,4 PC	44
Insectos		
Termitas, Rhodesia, 2 especies		
Obrera	1.500,0 PS	44
Soldado	300,0 PS	44
Reina	20,0 PS	44
Anélidos		
Lombrices		
Todo, 2 especies	5,0-10,2 PS	44
<i>Eisenia foetida</i>		
De planta de tratamiento de lodos cloacales conteniendo 299-650 ppm Cr		
Todo menos intestino		
2 semanas de residencia	1,0 PS	50
28 semanas de residencia	13,0 PS	50
Lombrices alimentadas con grano	0,8 PS	50
Alimentación en estiércol de ganado	ND	50
Aves		
<i>Anas rubripes</i>		
Huevo	0,6 PF	51
<i>Aythya valisineria</i>		
Hígado	0,02 PF	52
<i>Larus fuscus</i>		
Músculo, hígado, riñón, y huevo	<1,0 PF	4
<i>Pandion haliaetus</i>		
Hígado	0,2 PF	54
<i>Pelecanus occidentalis</i>		
Hígado	<0,2 PF	54
<i>Somateria mollissima</i>		
Músculo, hígado, riñón, y huevo	<1,0 PF	4
Ave acuática		
Plumas, 4 especies	<0,05 PS	55

Ecosistema, grupo taxonómico, organismo, tejido, localización y otras variables	Concentración (ppm)	Referencia ^a
Mamíferos		
<i>Antilocapra americana</i>		
Pelo		
Idaho	1,9-640,0 PS	44
Wyoming	0,3-130,0 PS	44
<i>Canis latrans</i>		
Pelo	0,7-12,0 PS	44
<i>Cervus canadensis</i>		
Pelo	1,9-570,0 PS	44
<i>Ovis canadensis</i>		
Pelo	<0,1 PS	44
<i>Sigmodon hispidus</i>		
Controles		
Hueso	0,2 PS	46,56
Cuero	0,1 PS	46,56
Pelo	0,4 PS	46,56
Tracto digestivo	1,1 PS	46,56
Todo	0,06 PF; 0,19 PS	46,56
Colectada a 100-130 m de desechos de torres enfriadoras		
Hueso	0,5 PS	46,56
Cuero	1,1 PS	46,56
Pelo	4,4 PS	46,56
Tracto digestivo	1,0 PS	46,56
Todo	0,12 PF; 0,40 PS	46,56
<i>Zapus princeps</i>		
Pelo	23,0-45,0 PS	44

Los valores están en mg Cr/kg (ppm), peso fresco (PF) del organismo completo o parte del cuerpo designada, peso seco (PS) o peso de las cenizas (PC); ND = no detectable.

^aReferencias: 1, Gryzhankova *et al.* 1973; 2, Riley y Roth 1971; 3, Bernhard y Zattera 1975; 4, Lande, 1977; 5, Foster 1976; 6, Bryan y Uysal 1978; 7 Phelps *et al.* 1975; 8, Ishibashi y Yamamoto 1960; 9, Pak *et al.* 1977; 10, Giblin *et al.* 1980; 11, Livingston y Thompson, 1971; 12, Anderlini 1974; 13, Shuster y Pringle 1968; 14, Segar *et al.* 1971; 15, Bryan *et al.* 1983; 16, Fukai 1965; 17, Graham 1972; 18, Bertine y Goldberg 1972; 19, Bryan y Hummerstone 1977; 20, Karbe *et al.* 1977; 21, Young y McDermott 1975; 22, Young *et al.* 1979; 23, Eisler *et al.* 1978; 24, Horowitz y Presley 1977; 25, Hall *et al.* 1978; 26, Greig *et al.* 1977; 27, Fukai y Broquet 1965; 28, Riley y Segar 1970; 29, Papadopoulou *et al.* 1976; 30, Papadopoulou y Kanas 1977; 31, Hawkins *et al.* 1980; 32, Greig y Wenzloff, 1977; 33, Brooks y Rumsey 1974; 34, Van As *et al.* 1973; 35, Plaskett y Potter 1979; 36, De Clerck *et al.* 1979; 37, Roth y Hornung 1977; 38, Papadopoulou y Kassimati 1977; 39 Duinker *et al.* 1979; 40, Duval *et al.* 1980; 41, Hall y Mulhern 1984; 42, Lucas *et al.* 1970; 43, Tong *et al.* 1974; 44, Jenkins 1980; 45, Gough y Severson 1976; 46, Taylor y Parr 1978; 47, Nadkarni y Ehmann 1970; 48 Schroeder *et al.* 1962; 49, Bates *et al.* 1975; 50, Hartenstein *et al.* 1980; 51, Haseltine *et al.* 1980; 52, White *et al.* 1980; 53, Wiemeyer *et al.* 1980; 54, Blus *et al.* 1977; 55, Kelsall 1970; 56, Taylor *et al.* 1975.

1.4. Hipótesis y objetivos

Se plantean a continuación las hipótesis de la tesis que involucran a este capítulo y se detallan las hipótesis y objetivos específicos del mismo.

1.4.a Hipótesis de la tesis que involucran este capítulo:

- **H1:** Las especies de anuros estudiadas son organismos adecuados para la realización de bioensayos en laboratorio.
- **H2:** La contaminación por cromo afecta la fase de vida acuática de los anuros estudiados.
- **H3:** El cromo hexavalente a bajas concentraciones es tóxico para las larvas de anuros estudiadas
 - **Pr3:** El intervalo de concentraciones de cromo en el que se observan efectos letales (0-100%) se encuentra a bajas concentraciones, en el orden de las partes por millón (mgCr(VI)/L).
- **H9:** Existen diferencias en cuanto a la sensibilidad que presentan las larvas de las diferentes especies de una misma comunidad al Cr(VI).
 - **H9.1:** Las especies mas emparentadas presentarán entre sí sensibilidades más similares que las especies filogenéticamente más alejadas, reflejándose en las jerarquías taxonómicas reconocidas (género, familia).
 - **H9.2:** Existe una relación entre el tipo ecológico de larva y la sensibilidad al Cr(VI) en bioensayos de toxicidad aguda con larvas en STD 25.
- **H10:** La realización de ensayos de toxicidad aguda sobre las fases de vida inicial de las distintas especies de una comunidad permite determinar una clasificación de sensibilidad de estas especies.
- **H11:** Existe una relación entre el hábito de vida de los adultos y la sensibilidad al Cr(VI) en bioensayos de toxicidad aguda con larvas en STD 25.
 - **Pr11:** Los adultos más acuáticos presentarán menor sensibilidad que los menos acuáticos (más terrestres).

1.4.b Hipótesis específicas de este capítulo:

Dentro de la hipótesis general: **H9:** “Existen diferencias en cuanto a la sensibilidad que presentan las larvas de las diferentes especies de una misma comunidad al Cromo (VI)”, se señalan las hipótesis específicas de este capítulo:

- **H9.1:** Las especies mas emparentadas presentarán entre sí sensibilidades más similares que las especies filogenéticamente más alejadas, reflejándose en las jerarquías taxonómicas reconocidas (género, familia).
 - **H91a:** Existen diferencias entre la sensibilidad de las diferentes especies de anuros estudiados.
 - **H91b:** Existen diferencias entre la sensibilidad de los diferentes generos de anuros estudiados
 - **Pr91b:** La diferencia entre géneros es mayor que la diferencia entre especies.
 - **H91c:** Existen diferencias entre la sensibilidad de los diferentes familias de anuros estudiados.
 - **Pr91c:** La diferencia entre familias es mayor que la diferencia entre géneros.
- **H92:** Existe una relación entre el tipo ecológico de larva y la sensibilidad al Cr(VI) en bioensayos de toxicidad aguda con larvas en STD 25.
 - **Pr92a:** Las larvas más nadadoras (hábitos nectónicos) poseen menor sensibilidad. Que las larvas de hábitos bentónicos (menos nadadoras).
 - **Pr92b:** Las larvas que poseen ciclos invernales poseen menor sensibilidad

1.4.c Objetivos específicos de este capítulo:

- Realizar bioensayos de toxicidad aguda estandarizados según la metodología propuesta, con larvas en estadio 25 de las especies encontradas en el área de estudio durante el período de estudio establecido.
- Estimar las curvas dosis–respuesta (en adelante curvas D-R) para cada una de las especies seleccionadas y calcular los distintos parámetros toxicológicos propuestos
- Comparar de modo descriptivo la sensibilidad relativa de las diferentes especies ensayadas al Cr(VI) y realizar comparaciones de la sensibilidad de las especies estudiadas en presente trabajo de tesis con otras especies publicadas.
- Efectuar comparaciones entre las curvas D-R estimadas, mediante la metodología estadística propuesta entre todas las especies estudiadas y los

diferentes agrupamientos realizados e interpretar la información obtenida de manera integral.

- Realizar análisis estadísticos complementarios que permitan corroborar los resultados obtenidos mediante comparación de resultados
- Contrastar las hipótesis que involucran la relación de la sensibilidad con las diferentes categorías sistemática propuestas (especie, género, familia).
- Realizar una interpretación integral de sensibilidad mostrada por las diferentes especies de la comunidad estudiada.

1.4.d Supuestos específicos del Capítulo IV acerca de la metodología de ensayo propuesta:

- Los huevos y larvas obtenidos a partir de la metodología de extracción propuesta no sufren ningún tipo de cambio que modifique su comportamiento natural, por lo que serían representativos de su desarrollo en la naturaleza.
- Las larvas de anuros se pueden desarrollar exitosamente en las condiciones de laboratorio planteadas, exhibiendo los mismos patrones de desarrollo descritos para condiciones naturales.
- Los huevos y larvas obtenidos a partir de la metodología propuesta, una vez en el laboratorio, estarían libres de las presiones de selección negativas que actúan sobre ellos en condiciones naturales (parasitismo, predación, enfermedades, radiaciones UV y contaminación química).
- Según el diseño experimental planteado y las condiciones de laboratorio controladas, no existe ningún factor que esté afectando negativamente el normal desarrollo de los individuos (huevos, embriones, larvas).
- El factor a evaluar (Concentración de cromo (VI) en agua) se plantea como un posible factor negativo fijo.

2 METODOLOGIA

Se efectuaron un total de 58 bioensayos de toxicidad aguda (Tabla 4, página subsiguiente). Todos los bioensayos incluidos en el presente capítulo se realizaron mediante la metodología propuesta en el Capítulo IV (ver más adelante, ítem 2.1.b). Esta metodología fue el punto de comparación asumido como válido para

contrastar las diferentes hipótesis planteadas y cumplir con los objetivos propuestos en el trabajo de tesis.

La metodología de este capítulo, en su totalidad, está estrechamente relacionada con el capítulo precedente. En primer lugar se realizará una revisión de los contenidos relacionados con el diseño experimental, profundizándose los puntos en que así se lo requirió para una mejor comprensión. En cuanto al análisis estadístico se adoptaron estrictamente los procedimientos propuestos en el ítem 2.2: “Análisis de datos” del Capítulo IV, donde se detallan los procedimientos matemáticos y estadísticos junto con la fundamentación de la elección de las técnicas, su modo de aplicación y su interpretación.

Con el objetivo de facilitar la visualización de las Tablas presentadas de aquí en adelante, se mostrarán en las mismas las características mencionadas de todos los ensayos, menos aquellos realizados con *H. pulchellus* (n=28), ya que los mismos fueron detallados en el capítulo anterior.

2.1 Bioensayos de toxicidad

Los organismos de ensayo se obtuvieron según la metodología descrita en el ítem 2.1.a del Capítulo IV: “Fuente de organismos”. En la (Tabla 5, página subsiguiente) se muestra el origen de las puestas ensayadas, además de algunas características que fueron utilizadas como variables de agrupamiento (especie, género, familia, tipo ecológico de larva y estacionalidad). Una vez en el laboratorio los organismos fueron aclimatados y seleccionados según los procedimientos detallados en el ítem 2.1.b del Capítulo IV: “Selección de organismos de ensayo”. El diseño del experimento se detalla en el ítem 2.1.c del Capítulo IV: “Diseño Experimental”. Las condiciones de laboratorio se especifican en el ítem 2.1.c₁ del Capítulo IV: “Determinación de las condiciones de laboratorio”, además de la justificación de la elección de los parámetros fisicoquímicos fijados: temperatura, fotoperíodo, pH, dureza, tratamiento del agua de ensayo (circulación, filtrado y eliminación de cloro), junto a argumentos para la selección del estadio de desarrollo y consecuentemente la edad a la cual fueron expuestos los renacuajos en los bioensayos realizados.

2.1.a Diseño experimental propuesto

El diseño experimental general aquí resumido (detallado en el ítem 2.1.c₂ del Capítulo IV), consistió en realizar bioensayos de toxicidad aguda, semiestáticos, con larvas de STD 25 provenientes de una misma puesta, en condiciones controladas de laboratorio (ver Figura 3 del Capítulo IV) (Temperatura = 25°C±1, Fotoperíodo = 16:8; pH = 7,65-8,30, dureza 120 mg CO₃Ca/L), utilizando agua de red filtrada, reposada y declorinada. En cada ensayo de toxicidad se prepararon 15 concentraciones [0,5; 1,5; 3; 6; 9; 12; 15; 18; 21; 24; 27; 30; 33; 36 y 60] mg Cr(VI)/L y dos grupos control. Las exposiciones se realizaron por cuadruplicado.

Los datos obtenidos de la puesta y lecturas de mortalidad diarias se volcaron en planillas. Una vez finalizado el bioensayo esta información fue transcrita a una base de datos (Excel) para su posterior análisis estadístico. (Figura 1)

Tabla 4 Bioensayos realizados

Ensayo Nº	Fecha	Especie	Estadio	Edad hs exposic.	N Conc.	Origen	Archivo	Clasific. a priori
1	26-mar-98	<i>H. pulchellus</i>	22-25	85	7	Camada B	HP260398SEPB	PRELIMINAR
2	27-mar-98	<i>H. pulchellus</i>	22-25	109	7	Camada A	HP270398SEPA	PRELIMINAR
3	01-abr-98	<i>H. pulchellus</i>	22-25	168	5	Camada X	HP010498DEPX	PRELIMINAR
4	06-abr-98	<i>H. pulchellus</i>	25	144	9	Camada C	HPO60498SEPC(FI)	PRELIMINAR
5	21-may-98	<i>H. pulchellus</i>	30	1320	8	Camada C y B	HP210598SEPC(FII)	DEFINITIVO
6	23-oct-98	<i>H. pulchellus</i>	25	120	9	Puesta Frison	H231098SEPF1	PRELIMINAR
7	24-oct-98	<i>H. pulchellus</i>	25	120	9	Puesta Frison	H231098SEPF3	PRELIMINAR
8	31-ene-99	<i>D. nanus</i>	25	140	9	P.molf1	HN310199SEP	DEFINITIVO
9	05-feb-99	<i>S. squalirostris</i>	9	24	8	P.molf2	SQ050299E(FI)	DEFINITIVO
10	07-feb-99	<i>H. pulchellus</i>	9	24	8	P.molf3	HP070299E	DEFINITIVO
11	10-feb-99	<i>S. squalirostris</i>	25	140	9	P.molf2	SQ100299SE(FII)	DEFINITIVO
12	12-feb-99	<i>H. pulchellus</i>	25	140	8	P.molf3	HP120299SE(FII)	DEFINITIVO
13	12-abr-00	<i>H. pulchellus</i>	25	120	8	P 07-04-00	HP120400SEP7	DEFINITIVO
14	05-sep-02	<i>H. pulchellus</i>	25	264	9	Amplexo X	HP5090296ALLP	DEFINITIVO
15	06-nov-02	<i>H. pulchellus</i>	25	240	8	P:115/24	HP6110224ALLP	ESTANDAR
16	23-dic-02	<i>P. biligonigerus</i>	25	120	8	P:123/31	PHB231202SEP123	ESTANDAR
17	30-dic-02	<i>B. fernandezae</i>	25	192	6	P:127/34	BF301202SEP127	ESTANDAR
18	30-dic-02	<i>L. ocellatus</i>	25	72	10	P:126/23	LO301202SEP126	ESTANDAR
19	30-dic-02	<i>P. biligonigerus</i>	25	288	10	P:123/31	PHB301202SEP123(FII)	ESTANDAR
20	30-dic-02	<i>S. berthae</i>	25	72	10	P:124/31	SB301202SEP124	ESTANDAR
21	09-abr-03	<i>H. pulchellus</i>	25	152	10	P:131/37	HP90403SEP131	ESTANDAR
22	09-abr-03	<i>H. pulchellus</i>	25	158	10	P:134/40	HP090403SEP134	ESTANDAR
23	10-abr-03	<i>H. pulchellus</i>	25	158	10	P:139/44	HP100403SEP139	ESTANDAR
24	14-abr-03	<i>H. pulchellus</i>	27	279	10	P:134/40	HP1403SEP134	ESTANDAR
25	14-abr-03	<i>H. pulchellus</i>	26	277	10	P:133/39	HP1403SEP133	ESTANDAR
26	14-abr-03	<i>H. pulchellus</i>	25	257	10	P:139/44	HP1403SEP139	ESTANDAR
27	05-may-03	<i>H. pulchellus</i>	28	800	14	P:133/39	HP50503SEP133	ESTANDAR
28	12-may-03	<i>H. pulchellus</i>	9	16	15	P:145/50	HP120503P145(FI)	ESTANDAR
29	19-may-03	<i>H. pulchellus</i>	25	152	15	P:145/50	HP190503SEP145(FII)	ESTANDAR
30	04-ago-03	<i>P. fernandezae</i>	25	89	15	P:150/55	PHF040803SEI	ESTANDAR
31	18-nov-03	<i>B. arenarum</i>	25	139	14	P:158/60	BA181103SEP158	ESTANDAR
32	19-nov-03	<i>B. fernandezae</i>	25	148	14	P:159/61	BF191103SEP159	ESTANDAR
33	30-abr-04	<i>S. squalirostris</i>	25	178	10	P:177/76	SS300404SEP177	ESTANDAR
34	17-may-04	<i>H. pulchellus</i>	25	588	7	P:176/75	HP140504SEP176	ESTANDAR
35	25-sep-04	<i>B. arenarum</i>	25	209	14	P:178/77	BA250904SEP178(BAI)	ESTANDAR
36	04-oct-04	<i>B. arenarum</i>	25	422	14	P:178/77	BA041004SEP178(BAII)	ESTANDAR
37	11-oct-04	<i>B. arenarum</i>	35	592	14	P:178/77	BA111004SEP178(BAIII)	ESTANDAR
38	09-nov-04	<i>S. granulatus</i>	25	17	14	P:189/90	SG091104EP189(FI)	ESTANDAR
39	15-nov-04	<i>S. granulatus</i>	25	161	19	P:191/82	SG151104SEP189(FII)	ESTANDAR
40	22-nov-04	<i>L. ocellatus</i>	25	161	19	P:194/85	LO221104SEP194	ESTANDAR
41	22-nov-04	<i>B. arenarum</i>	25	1512	15	P:178/77	BA221104SEP178(BAIV)	ESTANDAR
42	27-dic-04	<i>L. latinasus</i>	25	CAMPO	14	P:203/94	PSFA271204SEP203	ESTANDAR
43	16-mar-05	<i>H. pulchellus</i>	25	159	15	P:216/107	HP160305SEP216A	ESTANDAR
44	16-mar-05	<i>H. pulchellus</i>	25	159	15	P: 216/107	HP160305SEP216B	ESTANDAR
45	06-abr-05	<i>H. pulchellus</i>	25	159	13	P:222/113	HP060405SEP222(1)	ESTANDAR
46	06-abr-05	<i>H. pulchellus</i>	25	159	13	P:223/114	HP060405SEP223A	ESTANDAR
47	06-abr-05	<i>H. pulchellus</i>	25	159	13	P:223/114	HP060405SEP223B	ESTANDAR
48	25-abr-05	<i>H. pulchellus</i>	27	619	12	P:222/113	HP250405SEP222(2)	ESTANDAR
49	12-jun-05	<i>P. fernandezae</i>	25	127	11	P:227/118	PHF120605SEP227	ESTANDAR
50	15-jun-05	<i>X. laevis</i>	25	153	19	P:228/119	XL150605SEP228(2)	ESTANDAR
51	16-jul-05	<i>P. fernandezae</i>	25	120	8	P:232/123	PHF160705SEP232	ESTANDAR
52	07-ago-05	<i>P. fernandezae</i>	25	110	18	P:235/126	PHF070805SEP235	ESTANDAR
53	07-ago-05	<i>P. fernandezae</i>	25	110	18	P:234/125	PHF070805SEP254	ESTANDAR
54	01-ene-04	<i>P. biligonigerus</i>	25	126	15	P:166/68	PHB010104SEP166	ESTANDAR
55	18-ene-06	<i>B. arenarum</i>	25	171	12	P:283	BA180106SEP283	ESTANDAR
56	19-ene-06	<i>P. falcipes</i>	25	123	7	P:285	PF190106SEP285	ESTANDAR
57	11-feb-06	<i>B. arenarum</i>	25	CAMPO	13	P:324	BA110206SEP324	ESTANDAR

Tabla 5 Origen de las puestas, tipo ecológico, especie, género y familia a la cual pertenecen

Ensayo Nº	Fecha	Especie	Familia	Tipo ecológico	Estación	Origen	
						Localidad	Charca
8	31-ene-99	<i>D. nanus</i>	<i>Hylidae</i>	NECT	2	6	7
9	05-feb-99	<i>S. squalirostris</i>	<i>Hylidae</i>	NECT	2	6	7
10	07-feb-99	<i>D. nanus</i>	<i>Hylidae</i>	NECT	2	6	7
11	10-feb-99	<i>S. squalirostris</i>	<i>Hylidae</i>	NECT	2	6	7
16	23-dic-02	<i>P. biligonigerus</i>	<i>Leptodactylidae</i>	BENT	2	5	16
17	30-dic-02	<i>B. fernandezae</i>	<i>Bufonidae</i>	BENT	2	5	17
18	30-dic-02	<i>L. ocellatus</i>	<i>Leptodactylidae</i>	BENT	2	3	11
19	30-dic-02	<i>P. biligonigerus</i>	<i>Leptodactylidae</i>	NECT	2	3	11
20	30-dic-02	<i>S. berthae</i>	<i>Hylidae</i>	NECT	2	3	11
30	04-ago-03	<i>P. fernandezae</i>	<i>Leptodactylidae</i>	BENT	1	1	1
31	18-nov-03	<i>B. arenarum</i>	<i>Bufonidae</i>	BENT	2	2	3
32	19-nov-03	<i>B. fernandezae</i>	<i>Bufonidae</i>	BENT	2	2	3
33	30-abr-04	<i>S. squalirostris</i>	<i>Hylidae</i>	NECT	1	6	6
35	25-sep-04	<i>B. arenarum</i>	<i>Bufonidae</i>	BENT	2	2	3
36	04-oct-04	<i>B. arenarum</i>	<i>Bufonidae</i>	BENT	2	2	3
37	11-oct-04	<i>B. arenarum</i>	<i>Bufonidae</i>	BENT	2	2	3
38	09-nov-04	<i>S. granulatus</i>	<i>Hylidae</i>	NECT	2	2	5
39	15-nov-04	<i>S. granulatus</i>	<i>Hylidae</i>	NECT	2	2	5
40	22-nov-04	<i>L. ocellatus</i>	<i>Leptodactylidae</i>	BENT	2	2	2
41	22-nov-04	<i>B. arenarum</i>	<i>Bufonidae</i>	BENT	2	2	3
42	27-dic-04	<i>L. latinasus</i>	<i>Leptodactylidae</i>	BENT	2	5	17
49	12-jun-05	<i>P. fernandezae</i>	<i>Leptodactylidae</i>	BENT	1	2	3
50	15-jun-05	<i>X. laevis</i>	<i>Pipidae</i>	NECT	1		
51	16-jul-05	<i>P. fernandezae</i>	<i>Leptodactylidae</i>	BENT	1	4	13
52	07-ago-05	<i>P. fernandezae</i>	<i>Leptodactylidae</i>	BENT	1	1	1
53	07-ago-05	<i>P. fernandezae</i>	<i>Leptodactylidae</i>	BENT	1	4	13
54	01-ene-04	<i>P. biligonigerus</i>	<i>Leptodactylidae</i>	BENT	2	5	19
55	18-ene-06	<i>B. arenarum</i>	<i>Bufonidae</i>	BENT	2	2	3
56	19-ene-06	<i>P. falcipes</i>	<i>Leptodactylidae</i>	BENT	2	2	3
57	11-feb-06	<i>B. arenarum</i>	<i>Bufonidae</i>	BENT	2	2	3
58	11-feb-06	<i>P. falcipes</i>	<i>Leptodactylidae</i>	BENT	2	2	3

Por otra parte, una vez obtenidos los resultados se consideraron los criterios de aceptación propuestos en el ítem 2.1.d del Capítulo IV: “Las fuentes de variación en el diseño experimental”. Si bien fueron tratadas en el ítem 2.1.e del Capítulo IV: “Variaciones del diseño de experimental en los bioensayos de toxicidad aguda”, se realizan aquí algunas consideraciones referentes a las variaciones del diseño experimental ocurridas en la ejecución de los ensayos incluidos en el presente capítulo.

2.1.b Variaciones del diseño experimental

Las mismas estuvieron asociadas principalmente a variaciones del tipo no planificadas: disponibilidad de embriones y larvas de cada puesta, tipo de puesta, estadio en el que se encontraban las larvas y al grado de conocimiento de la sensibilidad de la especie a ensayar. Las mismas consistieron fundamentalmente, en cambios en el número de concentraciones utilizadas en cada ensayo, variando entre 6 y 19 concentraciones. No se realizaron ensayos asociados a este capítulo que implicaran variaciones de diseño vinculadas con factores modificantes

abióticos, realizándose todos las pruebas según el diseño experimental general o metodología estandarizada.

Figura 1 Tabla de datos brutos a analizar en Excel

Archivo Edición Ver Insertar Formato Herramientas Datos Ventana ?														
Cerrar pantalla completa														
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L		
1	SP	N° de Ensayo	Fecha de ensayo	CONCENTRACION	LOG (D)	Respuestas	n Total	Proporcion	%	Normaliz	Probit unit	ARCOS	TIEM	
2	10	1	26/03/98	17.5	1.243038049	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
3	10	1	26/03/98	3.5	0.544068044	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
4	10	1	26/03/98	3.5	0.544068044	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
5	10	1	26/03/98	35	1.544068044	5	5	1.00	100	#NUM!	#NUM!	0.00		
6	10	2	27/03/98	3.5	0.544068044	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
7	10	2	27/03/98	35	1.544068044	5	5	1.00	100	#NUM!	#NUM!	0.00		
8	10	2	27/03/98	3.5	0.544068044	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
9	10	3	01/04/98	17.5	1.243038049	1	10	0.10	10	-1.28	3.72	1.25		
10	10	3	01/04/98	35	1.544068044	3	10	0.30	30	-0.52	4.48	0.99		
11	10	3	01/04/98	52.5	1.720153303	3	10	0.30	30	-0.52	4.48	0.99		
12	10	3	01/04/98	70	1.84503804	5	10	0.50	50	0.00	5.00	0.79		
13	10	3	01/04/98	87.5	1.942008053	10	10	1.00	100	#NUM!	#NUM!	0.00		
14	10	3	01/04/98	17.5	1.243038049	4	10	0.40	40	-0.25	4.75	0.89		
15	10	3	01/04/98	35	1.544068044	6	10	0.60	60	0.25	5.25	0.68		
16	10	3	01/04/98	52.5	1.720153303	8	10	0.80	80	0.84	5.84	0.46		
17	10	3	01/04/98	87.5	1.942008053	10	10	1.00	100	#NUM!	#NUM!	0.00		
18	10	3	01/04/98	17.5	1.243038049	10	10	1.00	100	#NUM!	#NUM!	0.00		
19	10	3	01/04/98	35	1.544068044	10	10	1.00	100	#NUM!	#NUM!	0.00		
20	10	3	01/04/98	52.5	1.720153303	10	10	1.00	100	#NUM!	#NUM!	0.00		
21	10	3	01/04/98	70	1.84503804	9	10	0.90	90	1.28	6.28	0.32		
22	10	3	01/04/98	87.5	1.942008053	10	10	1.00	100	#NUM!	#NUM!	0.00		
23	10	3	01/04/98	17.5	1.243038049	10	10	1.00	100	#NUM!	#NUM!	0.00		
24	10	3	01/04/98	35	1.544068044	10	10	1.00	100	#NUM!	#NUM!	0.00		
25	10	3	01/04/98	52.5	1.720153303	10	10	1.00	100	#NUM!	#NUM!	0.00		
26	10	3	01/04/98	70	1.84503804	10	10	1.00	100	#NUM!	#NUM!	0.00		
27	10	3	01/04/98	87.5	1.942008053	10	10	1.00	100	#NUM!	#NUM!	0.00		
28	10	4	06/04/98	3.5	0.544068044	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
29	10	4	06/04/98	5.25	0.720153303	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
30	10	4	06/04/98	7	0.84503804	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
31	10	4	06/04/98	8.75	0.942008053	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
32	10	4	06/04/98	10.5	1.021189299	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
33	10	4	06/04/98	12.25	1.088136089	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
34	10	4	06/04/98	14	1.146128036	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
35	10	4	06/04/98	15.75	1.197280558	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
36	10	4	06/04/98	17.5	1.243038049	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
37	10	4	06/04/98	3.5	0.544068044	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
38	10	4	06/04/98	5.25	0.720153303	1	5	0.20	20	-0.84	4.16	1.11		
39	10	4	06/04/98	7	0.84503804	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
40	10	4	06/04/98	8.75	0.942008053	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		
41	10	4	06/04/98	10.5	1.021189299	1	5	0.20	20	-0.84	4.16	1.11		
42	10	4	06/04/98	12.25	1.088136089	0	5	0.00	0	#NUM!	#NUM!	1.57		

La variabilidad total se asumió, siguiendo el modelo presentado en el capítulo anterior, como compuesta por variabilidades parciales atribuibles a diferentes factores mediante la siguiente forma $VT = Vp + Vch + Va + Vespecie + \dots + Vn + Ve$, donde Vp representa la variabilidad de la puesta, Vch la variabilidad de la charca, Va la variabilidad anual o estacional, considerando a Vn como toda aquella variabilidad explicada por factores intrínsecos del ecosistema, ya sean bióticos o abióticos, y a Ve como la variabilidad del error o variabilidad no explicada. En el presente capítulo se considera dentro de este modelo de interpretación a la variabilidad debida a la especie y posteriormente a género y familia, reconocida por algunos autores como variabilidad innata (Klapow y Lewis, 1979), desplazando hacia el término del error, en el caso de algunas comparaciones (ver más adelante), las variabilidades producto del origen (población, charca), estacionalidad y puesta. Se consideró a la variabilidad debida a la especie como la fuente de variabilidad principal, tal cual se pensó al momento de plantear las hipótesis y objetivos en el plan de trabajo propuesto.

Al analizar los objetivos de este capítulo, los principios de mínima variación propuestos en el capítulo anterior carecen de sentido. Sólo el tercer principio podría cumplirse (principio de simultaneidad), siempre y cuando la colección de puestas se efectúe en un mismo lugar, y en el mejor de los casos, en la misma noche. Esto permitiría realizar, si los tiempos de desarrollo son similares, la ejecución de ensayos simultáneos. Es importante resaltar aquí que, debido a la biología de las especies estudiadas y las interacciones ecológicas que influyen sobre los procesos reproductivos (ver Figura 2 del Capítulo I), se hace muy difícil respetar estos principios e incluso darle relevancia a las distintas fuentes de variación antes mencionadas (origen, estacionalidad). Es de destacar, que en la planificación del presente trabajo de tesis se planteó a las especies de una misma familia como entidades muy afines, entre las que la variabilidad esperada sería mínima o despreciable (considerando la variabilidad propia de cada especie), no contemplándose la variación dentro de una misma especie entre diferentes ambientes, dentro de una misma zona o región geográfica. Ello llevó a considerar a algunas charcas cercanas al sistema de estudio, inclusive aquellas que constituían otras poblaciones, como posibles fuentes de huevos apropiadas para la comparación entre especies. Esto fue cuestionado posteriormente en el transcurso de la investigación, con el enunciado de nuevas hipótesis (poblacional y de estacionalidad, contrastadas en el Capítulo IV). Si bien conocemos a esta altura los resultados de la contrastación de estas hipótesis, se consideró adecuado realizar el procedimiento de análisis según los pasos propuestos en el plan de trabajo original. Ello implicaría comparar y evaluar en principio, la variabilidad entre las especies dejando fuera del análisis las “nuevas” fuentes de variación consideradas en el Capítulo IV (poblacional, estacional²).

2.2 Análisis de datos

2.2.a Tratamiento de datos

La totalidad de datos obtenidos fue organizada en una planilla de 22 columnas por 2934 filas, denominada planilla básica de datos (Figura 1). La misma fue explorada y analizada mediante las distintas técnicas estadísticas propuestas y sus resultados fueron agrupados en nuevas hojas de cálculo según el análisis realizado: regresiones, cálculos de LC(10-90) para 24, 48, 72 y 96h, comparaciones de curvas D-R, entre otras. De la totalidad de la información obtenida se seleccionaron aquellas filas que contenían la información sobre las exposiciones agudas a 96h en los 58 ensayos, lo que representó un 23,41% de la información producida.

² Consideramos que evaluar la *variabilidad estacional* en el análisis de diferentes especies que poseen estrategias adaptativas diferentes y se reproducen quizá en estaciones distintas, no tiene mucho sentido. En el caso de las *poblaciones*, las dificultades de recolección de puestas de algunas de las especies, requirió para poder incluirla en el análisis, colectas en otro sitio reproductivo cercano.

En la Tabla 4 se muestra la fracción de resultados seleccionados para su posterior utilización en las diferentes etapas del análisis de datos (n=58). En primera instancia a partir de esta tabla se analizó la variabilidad total de los resultados obtenidos siguiendo los procedimientos del capítulo anterior. Una vez procesada la totalidad de los resultados, se efectuaron las clasificaciones según los criterios de aceptación propuestos. En la Tabla 6 (página siguiente), se muestran los resultados de esta selección para los bioensayos practicados, excepto los bioensayos con *H. pulchellus* (n=28). A partir de esta última tabla, se seleccionaron las curvas D-R que cumplieron los criterios de aceptación. Una vez seleccionadas fueron analizadas por regresión y correlación, previa sustracción de los valores mínimos y máximos que se encontraban repetidos más de dos veces.

Posteriormente se calcularon las LC50 para cada grupo de datos proveniente de los ensayos realizados por separado, siguiendo la metodología propuesta. Por último se seleccionó una curva representativa para cada especie. En los casos que existieron más de dos, respetando los criterios asumidos, se procedió a fusionar los grupos de datos recalculando una curva general D-R, asignándole una nueva denominación. En la Tabla 7 (página subsiguiente), se muestra el resultado de esta selección, en la que quedaron 13 curvas finales, las que fueron utilizadas para contrastar las hipótesis planteadas en el presente capítulo (Tabla 8, página subsiguiente), mediante los procedimientos estadísticos que se detallan a continuación.

2.2.b Análisis de datos

Como mencionamos en la introducción, el análisis de datos siguió estrictamente los procedimientos propuestos en el capítulo anterior. A continuación y con motivo de facilitar la lectura, se hace un resumen de los análisis estadísticos realizados (para más detalle ver ítem 2.2 del Capítulo IV: “Análisis de datos”), donde se detallan los procedimientos matemáticos y estadísticos junto con la fundamentación de la elección de las técnicas utilizadas, su modo de aplicación y su interpretación.

Los puntos finales evaluados desde el punto de vista toxicológico, fueron en el presente capítulo, la mortalidad a las 24, 48, 72 y 96h observada en los ensayos agudos. El análisis realizado para cada grupo de resultados obtenidos a partir de cada bioensayo, consistió en la aplicación -por medio de planillas de Excel- del análisis Probit propuesto por (Finney, 1971), con el objetivo de estimar la curva D-R, de cada especie respecto al Cr(VI) y posteriormente calcular las LC50 y sus límites de confianza al 95%. Posteriormente los mismos grupos de datos fueron corridos en el Programa de Análisis Probit (*Probit Analysis Program*), versión 1.5. Los resultados arrojados por el mismo, además de permitir su comparación con los de otras investigaciones, fueron un punto válido de comparación para verificar los obtenidos anteriormente y por otra parte para corroborar los supuestos de los métodos utilizados como por ejemplo: ajuste de los datos al modelo probit (contrastado mediante una prueba de bondad de ajuste con el estadístico CHI-

cuadrado), y los supuestos del análisis de regresión lineal simple (prueba de significancia para la pendiente).

Para cada curva D-R, se realizó análisis de regresión y se graficaron los ajustes para las distintas curvas, además de análisis de correlación en los que se estimaron los parámetros de correlación: r coeficiente de correlación simple³, coeficientes de determinación r^2 , y se hizo la prueba de significancia para r en cada caso, expresando su significancia como p y considerando un nivel de significancia ($\alpha = 0,05$).

La significancia entre curvas D-R, se resolvió mediante pruebas de comparación de pendientes y ordenadas al origen en los casos en los que se compararon sensibilidades de diferentes especies, géneros y familias, además de otras fuentes de variación analizadas como ser estacionalidad y hábito de las larvas de las especies estudiadas.

Para el mejor aprovechamiento de los datos se hicieron en las distintas etapas los análisis estadísticos descriptivos que permitieron, además de resumir la información, comparar e interpretar de manera integral los resultados mediante la visualización de las tablas y gráficos elaborados.

El efecto sobre la sensibilidad, expresada como $LC50_{96h}$, producido por los distintos agrupamientos realizados (familia, género, tipo ecológico de larva), fue evaluado mediante un ANOVA simple, por medio de una prueba de aleatorización ("*randomization test*") utilizando el método de Monte Carlo del programa EcoSim versión 7.24 (Gotelli y Entsminger, 2001; Gotelli y Ellison, 2004), para lo cual se establecieron 1000 iteraciones.

Por último, para las curvas D-R seleccionadas se realizaron distintas clasificaciones (*ranking*) de las especies según su sensibilidad ($LC50_{96h}$ –mgCr(VI)/L-) siguiendo diferentes criterios de comparación o agrupamiento: En primer lugar se ordenaron los valores de $LC50_{96h}$ –mgCr(VI)/L obtenidos para cada especie de manera creciente (*ranking*), indicándose las significancias obtenidas entre las diferentes especies, resultando diferentes categorías de sensibilidades. Posteriormente, siguiendo el criterio propuesto por Birge *et al.* (2000), se realizó una comparación de la sensibilidad ($LC50_{96h}$ –mgCr(VI)/L-) de larvas de estadio 25, obtenida a partir de bioensayos de toxicidad aguda propuestos, en comparación con la sensibilidad obtenida para trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) respecto del Cr(VI). La comparación se hizo por medio del índice de riesgo químico (*chemical hazard index*) (en adelante **CHI**), calculado de la siguiente forma:

$$CHI = LC50_{96h} \text{ especie de anuro} / LC50_{96h} \text{ trucha arcoiris.}$$

³ También conocido como "Coeficiente de correlación producto–momento de Pearson",

Tabla 6 Criterios de aceptación de los resultados obtenidos (sin *H. pulchellus*)

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN																				
					a priori						a posteriori							CONCLUSIÓN		
Ensayo					Concentraciones			Intervalo evaluado			Respuesta			Variabilidad						
Ens Nº	Especie	Clasifi- cación	Répli-	Nºorg	Ntot	Nefc	Nres	MIN	MAX	RANGO	LC50- 96h	LCI	LCS	RANGO	F.V.	%			CRITERIO	FUNDAMENTACIÓN
8	D.nanus	DEFINITIVO	3	15	9	6	5	1,75	26,25	24,50	11,00	8,130	14,830	6,7	1,8	30	V		A	
9	S.squalirostris	DEFINITIVO	3	15	8	8	8	1,75	26,25	0,00	9,00	7,500	10,100	2,6	1,3	14	V	STD 9, 24h	R	DET
10	D.nanus	DEFINITIVO	3	15	8	8	8	1,75	26,25	0,00	11,30						V	STD 9, 24h	R	DET
11	S.squalirostris	DEFINITIVO	3	15	9	5	3	1,75	26,25	24,50	4,20	2,890	5,630	2,7	1,9	33	X*		R	CORR
16	P.biligonigerus	ESTANDAR	4	20	8	6	5	3,00	24,00	21,00	3,90	2,884	4,697	1,8	1,6	23	X*		R	CORR
17	B.fernandezae	ESTANDAR	3	15	6	5	4	3,00	27,00	24,00	19,70	17,701	22,018	4,3	1,2	11	X*		R	CORR
18	L.ocellatus	ESTANDAR	4	20	10			3,00	30,00	27,00							X		R	FUERA DE RANGO
19	P.biligonigerus	ESTANDAR	4	20	10	10	10	0,10	30,00	29,90	7,10						X		R	FUERA DE RANGO
20	S.berthae	ESTANDAR	4	20	10	6	5	3,00	30,00	27,00	7,20	6,181	8,171	2,0	1,3	14	V		A	
30	P.fernandezae	ESTANDAR	4	20	15	15	15	0,10	24,00	23,90	>24,00						X		R	FUERA DE RANGO
31	B.arenarum	ESTANDAR	4	20	14	12	10	1,00	60,00	59,00	17,80	15,980	19,665	3,7	1,2	10	V		A	
32	B.fernandezae	ESTANDAR	4	20	14	13	11	1,00	60,00	59,00	11,80	9,783	13,679	3,9	1,4	17	V		A	
33	S.squalirostris	ESTANDAR	4	20	8	7	6	1,00	10,00	9,00	1,40	0,976	2,062	1,1	2,1	38	V		A	
35	B.arenarum	ESTANDAR	4	20	14	12	10	0,10	60,00	59,90	45,20	29,335	89,744	60,4	3,1	67	V		R	VARIABILIDAD
36	B.arenarum	ESTANDAR	4	20	14	14	12	1,00	60,00	59,00	7,90	6,279	9,553	3,3	1,5	21	V	Edad 422h	R	DET
37	B.arenarum	ESTANDAR	4	20	14	12	11	1,00	60,00	59,00	30,60	25,701	38,716	13,0	1,5	21	V	Edad 592h	R	DET
38	S.granulatus	ESTANDAR	4	20	19			0,50	120,00	119,50							V	STD 9, 17h	R	DET
39	S.granulatus	ESTANDAR	4	20	19	9	7	0,10	120,00	119,90	12,20	10,812	13,524	2,7	1,3	11	V		A	
40	L.ocellatus	ESTANDAR	4	20	19	8	7	0,10	120,00	119,90	2,00	0,070	4,156	4,1	59,4	102	X*		R	CORR
41	B.arenarum	ESTANDAR	4	20	15	10	6	1,00	120,00	119,00	50,90	44,903	60,431	15,5	1,3	15	V	Edad 1512h	R	DET
42	L.latinasus	ESTANDAR	4	20	14	10	10	1,00	60,00	59,00	19,20	14,468	22,954	8,5	1,6	22	V	CAMPO	R	DET
49	P.fernandezae	ESTANDAR	4	20	11	9	3	0,10	120,00	119,90	14,70	12,521	16,579	4,1	1,3	14	V		R	PRECISIÓN (N=3)
50	X.laevis	ESTANDAR	4	20	19	19	14	0,10	120,00	119,90	18,90	15,455	22,392	6,9	1,4	18	V		A	
51	P.fernandezae	ESTANDAR	4	20	8	6	4	6,00	60,00	54,00	51,70	44,296	65,426	21,1	1,5	20	V		R	ORIGEN
52	P.fernandezae	ESTANDAR	4	20	18	13	10	1,00	120,00	119,00	21,60	19,558	23,849	4,3	1,2	10	V		A	
53	P.fernandezae	ESTANDAR	4	20	18	10	5	1,00	120,00	119,00	40,30	37,241	43,629	6,4	1,2	8	V		R	ORIGEN
54	P.biligonigerus	ESTANDAR	4	20	15	7	5	1,00	60,00	59,00	6,00	5,214	7,069	1,9	1,4	15	X*		R	CORR
55	B.arenarum	ESTANDAR	4	20	12	9	6	1,00	120,00	119,00	11,60	8,592	14,664	6,1	1,7	26	X*		R	CORR
56	P.falcipes	ESTANDAR	4	20	7	2	2	3,00	120,00	117,00	2,80						X		R	
57	B.arenarum	ESTANDAR	4	20	13	6	3	0,10	120,00	119,90	38,00	31,449	44,230	12,8	1,4	17	V	CAMPO	R	DET
58	P.falcipes	ESTANDAR	4	20	10	5	2	0,10	120,00	119,90	30,80	24,855	37,016	12,2	1,5	20	X*	CAMPO	R	DET + CORR

X* Significa que la correlación no fue significativa $p < 0,05$

Tabla 7 Tabla de las 13 curvas finales analizadas resultado de la selección

Ensayo Nº	Selección	Curva evaluada	Especie	Familia	Clasificación	Réplicas	MIN	MAX	CRITERIO
55 31	Mejor	31	<i>B. arenarum</i>	<i>Bunfonidae</i>	ESTANDAR	4	1,00	60,00	A
17 32	Mejor	32	<i>B. fernandezae</i>	<i>Bunfonidae</i>	ESTANDAR	4	1,00	60,00	A
8	Mejor	8	<i>D. nanus</i>	<i>Hylidae</i>	DEFINITIVO	3	1,75	26,25	A
43 44	Fusión	MOLF 4344	<i>H. pulchellus</i>	<i>Hylidae</i>	ESTANDAR	4	0,50	60,00	A
42	Mejor	42	<i>L. latinasus</i>	<i>Leptodactylida e</i>	ESTANDAR	4	1,00	60,00	R
40	Mejor	40	<i>L. ocellatus</i>	<i>Leptodactylida e</i>	ESTANDAR	4	0,10	120,00	R
16 54	Fusión	PBIL 5416	<i>P. biligonigerus</i>	<i>Leptodactylida e</i>	ESTANDAR	4	0,10	60,00	A
53	Mejor	53	<i>P. fernandezae</i>	<i>Leptodactylida e</i>	ESTANDAR	4	1,00	120,00	R
52	Mejor	52	<i>P. fernandezae</i>	<i>Leptodactylida e</i>	ESTANDAR	4	1,00	120,00	A
20	Mejor	20	<i>S. berthae</i>	<i>Hylidae</i>	ESTANDAR	4	3,00	30,00	A
39	Mejor	39	<i>S. granulatus</i>	<i>Hylidae</i>	ESTANDAR	4	0,10	120,00	A
11 33	Mejor	33	<i>S. squalirostris</i>	<i>Hylidae</i>	ESTANDAR	4	1,00	10,00	A
50	Mejor	50	<i>X. laevis</i>	<i>Pipidae</i>	ESTANDAR	4	0,10	120,00	A

Mejor significa que se seleccionó la mejor de las dos, ya que mantenían diferencias significativas.

Fusión es que al comportarse como réplicas, se fusionaron formando una nueva curva.

Se fundamenta esta comparación en que *Oncorhynchus mykiss* es considerada una especie muy sensible, utilizada frecuentemente como referencia (*benchmark*) (Birge *et al.*, 2000). Los valores de CHI menores a 0,5 indicarán especies muy sensibles, valores entre 0,5 y 1,5 indicarán especies sensibles; valores entre 1,6 y 3 denotarán especies moderadamente tolerantes y valores superiores a 3 indicarán especies tolerantes.

3 RESULTADOS

En la Tabla 9 (página subsiguiente), se muestran los resultados obtenidos para la totalidad de los ensayos realizados (n=58).

En la Tabla 10 y en la Figura 2 (páginas subsiguientes) se muestra la distribución de frecuencias de las concentraciones ensayadas, de los 0 y 100% de mortalidad obtenidos en cada ensayo, además de las LC50 calculadas para las 96h, en los diferentes bioensayos realizados.

Tabla 8 Hipótesis planteadas en el presente capítulo y metodologías de contrastación

Hipótesis	Denominación		Diseño	Curvas-D-R	Método	Hipótesis nula
H1, H2, H3	Hipótesis de Variabilidad Total		Todos los ensayos	58 curvas (Tabla 4)	Comparación de regresiones lineales	Todas las a son iguales
H7	Hipótesis de Tamaño					Todas las b son iguales
H9 Hipótesis de los elementos de una comunidad	Hipótesis Filogenética	Especies	13 especies	13 curvas (Tabla 7)		Todas las a son iguales
		Género	<i>Bufo</i>	E31 (BA) y E32 (BF)		Todas las b son iguales
			<i>Leptodactylus</i>	E40 (LO) y E42 (LL)		a31=a32
			<i>Physalaemus</i>	E52 (PFL), E53 (PFI) y PBIL5416 (PB)		b31=b32
			<i>Scinax</i>	E20 (SB), E33 (SS) y E39 (SG)		a40=a42
						b40=b42
						a52=a53=aPBIL5416
						b52=b53=bPBIL5416
		Género	7 géneros	13 curvas (Tabla 7)		a20=a33=a39
		Familia	4 familias	13 curvas (Tabla 7)		b20=b33=b39
	Hipótesis Ecológica	Tipo ecológico de larva	Tipo ecológico de larva	13 curvas (Tabla 7)	Prueba ANOVA de aleatorización	Todos los géneros son iguales
		Estacionalidad	Invernal-estival	13 curvas (Tabla 7)		Todas las familias son iguales
		Hábitos adultos	Hábitos adultos	13 curvas (Tabla 7)		No existen diferencias entre los tipos ecológicos de larvas
						No existen diferencias entre invernal-estival
						No existen diferencias entre hábitos adultos

Los resultados obtenidos a partir de la totalidad de ensayos realizados con todas las especies muestran que los efectos letales se encuentran a partir de 0,07 y 6 mg Cr(VI)/L (0% de efecto) hasta 15 a 80 mg Cr(VI)/L (100% de efecto) en el 80% de los casos (Tabla 10 y Figura 2). Los límites promedio de concentraciones que representan este intervalo son de 9,29 y 48,55 mg Cr(VI)/L, para 0 y 100% de mortalidad respectivamente. Estos resultados están a favor de la **H3**: “El cromo hexavalente a bajas concentraciones es tóxico para las larvas de anuros estudiadas” y de su predicción **Pr3**: “El intervalo de concentraciones de cromo en el que se observan efectos letales (0-100%) se encuentra a bajas concentraciones, en el orden de las partes por millón.”

La variabilidad total (VT) de los ensayos realizados con las distintas especies (n=58), se ilustra en la Figura 3, utilizando el diseño de las cartas control, como una forma de mostrar la VT presente entre los ensayos. Debido a que como se mostró en la (Tabla 9) en 8 casos las LC50 no pudieron ser calculadas, se muestran los resultados de 50 ensayos.

En la Tabla 11 (páginas subsiguientes) se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico descriptivo de la variabilidad total realizado para las variables concentración (mgCr(VI)/L) y Log10(concentración), para los distintos puntos finales evaluados a las 96h (0 y 100% de efecto y LC1-LC10-LC50 y LC99).

Los mismos ilustran la variabilidad total para los 50 ensayos realizados en los distintos sectores de la curva dosis respuesta general. Al contemplar las LC50's calculadas para este caso se observa que la variabilidad evaluada presenta un **CV** de 0,32 un **FV** de 1,58, lo que indica una variabilidad del 25,59% en la respuesta.

Tabla 9 Resultados obtenidos de la totalidad de los ensayos realizados (n=58)

Criterios de aceptación										
<i>a priori</i>				<i>a posteriori</i>						
Ensayo				Respuesta			Variabilidad			AJU
Ensayo Nº	Especie	Clasificación	Réplicas	LC50	LCI	LCS	RANGO	F.V.	%	
1	<i>H. pulchellus</i>	PRELIMINAR	no	-	-	-	-	-	-	X
2	<i>H. pulchellus</i>	PRELIMINAR	no	-	-	-	-	-	-	X
3	<i>H. pulchellus</i>	PRELIMINAR	no	-	-	-	-	-	-	X
4	<i>H. pulchellus</i>	PRELIMINAR	no	9,1	6,750	11,460	4,70	1,7	26	X*
5	<i>H. pulchellus</i>	DEFINITIVO	3	62,9	55,880	69,980	14,10	1,3	11	X*
6	<i>H. pulchellus</i>	PRELIMINAR	3	23,9	19,060	3,980,000	3.960,90	208,8	8.280	X*
7	<i>H. pulchellus</i>	PRELIMINAR	3	15,4	-	-	-	-	-	X
8	<i>D. nanus</i>	DEFINITIVO	3	11,0	8,130	14,830	6,7	1,8	30	V
9	<i>S. squalirostris</i>	DEFINITIVO	3	9,0	7,500	10,100	2,6	1,3	14	V
10	<i>H. pulchellus</i>	DEFINITIVO	3	>22,5	-	-	-	-	-	X
11	<i>S. squalirostris</i>	DEFINITIVO	3	4,2	2,890	5,630	2,7	1,9	33	X*
12	<i>H. pulchellus</i>	DEFINITIVO	3	19,4	16,614	23,096	6,5	1,4	17	V
13	<i>H. pulchellus</i>	DEFINITIVO	3	9,3	5,635	12,202	6,6	2,2	35	V
14	<i>H. pulchellus</i>	DEFINITIVO	3	24,1	20,477	30,891	10,4	1,5	22	X*
15	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	13,6	12,008	13,105	1,1	1,1	4	V
16	<i>P. biligonigerus</i>	ESTANDAR	4	3,9	2,884	4,697	1,8	1,6	23	X*
17	<i>B. fernandezae</i>	ESTANDAR	3	19,7	17,701	22,018	4,3	1,2	11	X*
18	<i>L. ocellatus</i>	ESTANDAR	4	-	-	-	-	-	-	X
19	<i>P. biligonigerus</i>	ESTANDAR	4	7,1	-	-	-	-	-	X
20	<i>S. berthae</i>	ESTANDAR	4	7,2	6,181	8,171	2,0	1,3	14	V
21	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	14,8	12,539	16,757	4,2	1,3	14	V
22	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	9,7	7,391	11,422	4,0	1,5	21	V
23	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	11,6	8,654	14,254	5,6	1,6	24	V
24	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	<9,0	-	-	-	-	-	X
25	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	<9,0	-	-	-	-	-	X
26	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	6,0	1,597	9,219	7,6	5,8	63	X*
27	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	7,3	4,852	9,282	4,4	1,9	31	V
28	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	>60,0	-	-	-	-	-	X
29	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	29,6	27,458	31,942	4,5	1,2	8	V
30	<i>P. fernandezae</i>	ESTANDAR	4	> 24,0	-	-	-	-	-	X
31	<i>B. arenarum</i>	ESTANDAR	4	17,8	15,980	19,665	3,7	1,2	10	V
32	<i>B. fernandezae</i>	ESTANDAR	4	11,8	9,783	13,679	3,9	1,4	17	V
33	<i>S. squalirostris</i>	ESTANDAR	4	1,4	0,976	2,062	1,1	2,1	38	V
34	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	<9,0	-	-	-	-	-	X
35	<i>B. arenarum</i>	ESTANDAR	4	45,2	29,335	89,744	60,4	3,1	67	V
36	<i>B. arenarum</i>	ESTANDAR	4	7,9	6,279	9,553	3,3	1,5	21	V
37	<i>B. arenarum</i>	ESTANDAR	4	30,6	25,701	38,716	13,0	1,5	21	V
38	<i>S. granulatus</i>	ESTANDAR	4	-	-	-	-	-	-	V
39	<i>S. granulatus</i>	ESTANDAR	4	12,2	10,812	13,524	2,7	1,3	11	V
40	<i>L. ocellatus</i>	ESTANDAR	4	2,0	0,070	4,156	4,1	59,4	102	X*
41	<i>B. arenarum</i>	ESTANDAR	4	50,9	44,903	60,431	15,5	1,3	15	V
42	<i>L. latinasus</i>	ESTANDAR	4	19,2	14,468	22,954	8,5	1,6	22	V
43	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	16,5	14,307	18,268	4,0	1,3	12	V
44	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	14,2	12,945	15,333	2,4	1,2	8	V
45	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	15,5	13,485	17,527	4,0	1,3	13	V
46	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	15,1	13,149	17,009	3,9	1,3	13	V
47	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	6,0	4,181	7,073	2,9	1,7	24	V
48	<i>H. pulchellus</i>	ESTANDAR	4	4,2	2,255	6,249	4,0	2,8	48	V
49	<i>P. fernandezae</i>	ESTANDAR	4	14,7	12,521	16,579	4,1	1,3	14	V
50	<i>X. laevis</i>	ESTANDAR	4	18,9	15,455	22,392	6,9	1,4	18	V
51	<i>P. fernandezae</i>	ESTANDAR	4	51,7	44,296	65,426	21,1	1,5	20	V
52	<i>P. fernandezae</i>	ESTANDAR	4	21,6	19,558	23,849	4,3	1,2	10	V
53	<i>P. fernandezae</i>	ESTANDAR	4	40,3	37,241	43,629	6,4	1,2	8	V
54	<i>P. biligonigerus</i>	ESTANDAR	4	6,0	5,214	7,069	1,9	1,4	15	X*
55	<i>B. arenarum</i>	ESTANDAR	4	11,6	8,592	14,664	6,1	1,7	26	X*
56	<i>P. falcipes</i>	ESTANDAR	4	2,8	-	-	-	-	-	X
57	<i>B. arenarum</i>	ESTANDAR	4	38,0	31,449	44,230	12,8	1,4	17	V
58	<i>P. falcipes</i>	ESTANDAR	4	30,8	24,855	37,016	12,2	1,5	20	X*

X* significa que la correlación no fue significativa $p < 0,05$

Tabla 10 Distribución de frecuencias de las concentraciones ensayadas

mgCr(VI)Lr	Frecuencia 0%	Frecuencia 100%	Frecuencia acumulada 0%	Frecuencia acumulada 100%	Frecuencia concentraciones
0,00	67		37	0	89
0,05	1		38	0	1
0,10	7		42	0	11
0,25	3		44	0	5
0,50	5		46	0	14
0,75	2		47	0	4
1,00	13		55	0	22
1,44			55	0	
1,50	3		56	0	7
1,75	1		57	0	2
2,00	2		58	0	3
2,50	1		59	0	2
2,79			59	0	
3,00	19		69	0	34
3,50	3		71	0	5
3,80	1		72	0	1
3,86			72	0	
4,00			72	0	3
4,18			72	0	
4,23			72	0	
5,00	1		72	0	3
5,25	1		73	0	3
5,54			73	0	
5,96			73	0	
5,99			73	0	
6,00	12	1	79	1	32
7,00	1		80	1	2
7,07			80	1	
7,23			80	1	
7,26			80	1	
7,90			80	1	
8,00			80	1	1
8,75	2		81	1	3
9,00	6	4	84	3	37
9,03			84	3	
9,10			84	3	
9,29			84	3	
9,72			84	3	
10,00		1	84	4	1
10,50	1		85	4	3
10,99			85	4	
11,26			85	4	
11,55			85	4	
11,60			85	4	
11,77			85	4	
12,00	7	6	89	8	38
12,22			89	8	
12,25			89	8	3
13,63			89	8	
14,00	2		90	8	3
14,18			90	8	
14,66			90	8	
14,82			90	8	
15,00	3	6	92	11	35
15,06			92	11	
15,44			92	11	
15,53			92	11	
15,75		1	92	12	3
16,54			92	12	
17,50	1	2	92	13	5
17,84			92	13	
18,00	4	6	94	17	36
18,88			94	17	

mgCr(VI)Lr	Frecuencia 0%	Frecuencia 100%	Frecuencia acumulada 0%	Frecuencia acumulada 100%	Frecuencia concentraciones
19,25			94	17	
19,25			94	17	1
19,37			94	17	
19,67			94	17	
21,00	1	13	95	25	34
21,63			95	25	
22,75			95	25	1
23,92			95	25	
24,00	3	9	97	31	36
24,06			97	31	
24,50	1		97	31	2
25,00	1		98	31	2
26,75			98	31	1
27,00		14	98	40	32
29,59			98	40	
30,00	3	13	99	48	37
30,55			99	48	
30,82			99	48	
31,50			99	48	1
33,00		11	99	55	21
35,00	1	2	100	56	4
36,00		9	100	62	22
38,01			100	62	
38,50		1	100	63	1
39,00		1	100	63	2
40,00		3	100	65	6
40,26			100	65	
42,00			100	65	1
45,00		2	100	66	4
45,15			100	66	
45,50		1	100	67	1
50,00		4	100	70	7
50,85			100	70	
51,75			100	70	
52,50		2	100	71	3
55,00		1	100	72	2
59,50		1	100	72	1
60,00		19	100	84	27
62,92			100	84	
65,00		1	100	85	2
70,00		3	100	87	4
75,00		1	100	87	2
80,00		2	100	89	2
87,50		2	100	90	2
90,00		3	100	92	3
90,00		1	100	92	
120,00		12	100	100	12

En la columna de concentraciones se indican en negrita las LC50_{96h} calculadas experimentalmente

Parte de la variabilidad evaluada anteriormente fue aportada por las curvas D-R, de los ensayos que no cumplieron con los distintos criterios de aceptación. Como se mencionó en la metodología, se seleccionaron las curvas D-R que cumplieron los criterios de aceptación con el objetivo de eliminar las diferentes fuentes de variación explicadas y poder contrastar las hipótesis planteadas en el presente capítulo (Tabla 8). La selección involucró un 22% de los ensayos realizados, siendo 13 el número final de curvas aceptadas. Los análisis estadísticos que involucraron curvas descartadas o nuevas curvas fueron realizados nuevamente. En la Figura 4 se muestra la totalidad de las curvas D-R estimadas de los ensayos seleccionados (n=13).

Figura 2 Distribución de frecuencias de las concentraciones ensayadas, de los 0 y 100% de mortalidad obtenidos en cada ensayo, las LC1, LC10, LC50 y LC99 estimadas para las 96hs, calculadas en los diferentes bioensayos realizados

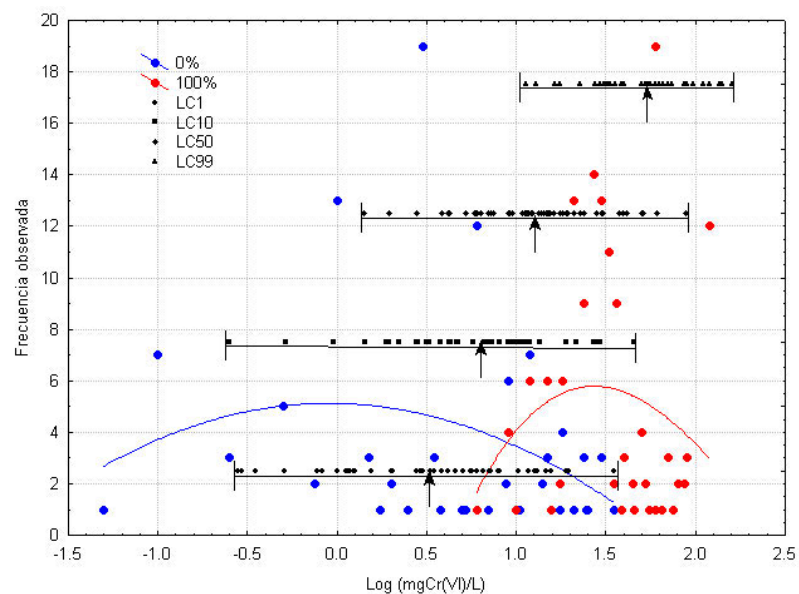


Figura 3 Tabla control de la VT

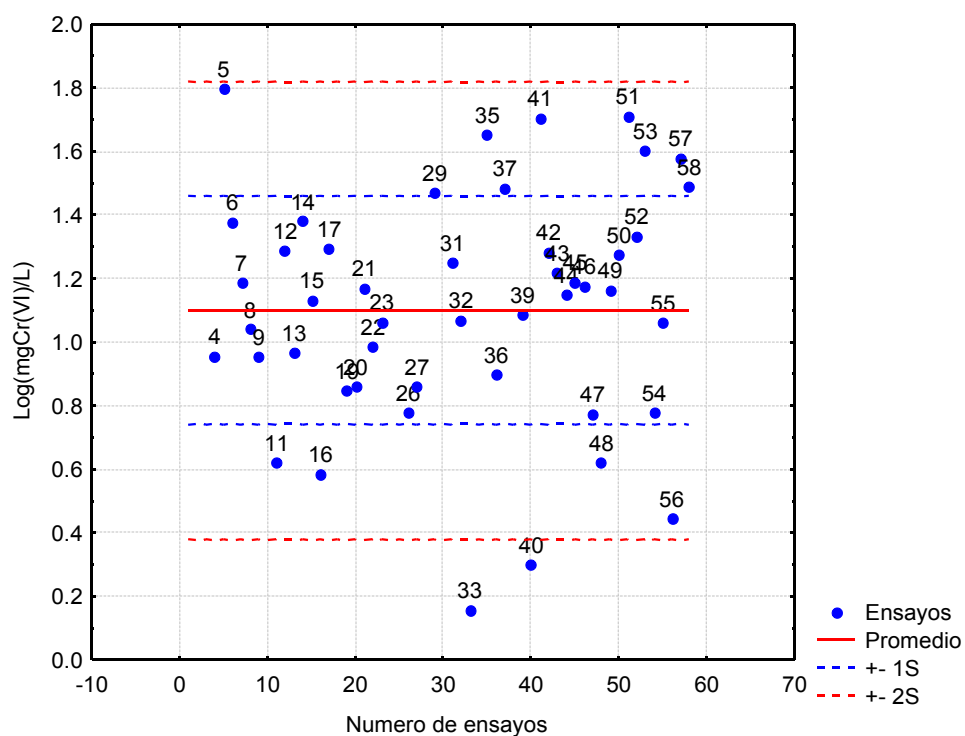


Tabla 11 Resultados obtenidos a partir del análisis estadístico descriptivo de la variabilidad total realizado para las variables concentración (mgCr(VI)/L) y Log10 (concentración), para los distintos puntos finales evaluados a las 96hs (0 y 100% de efecto y LC1, LC10, LC50 Y LC99).

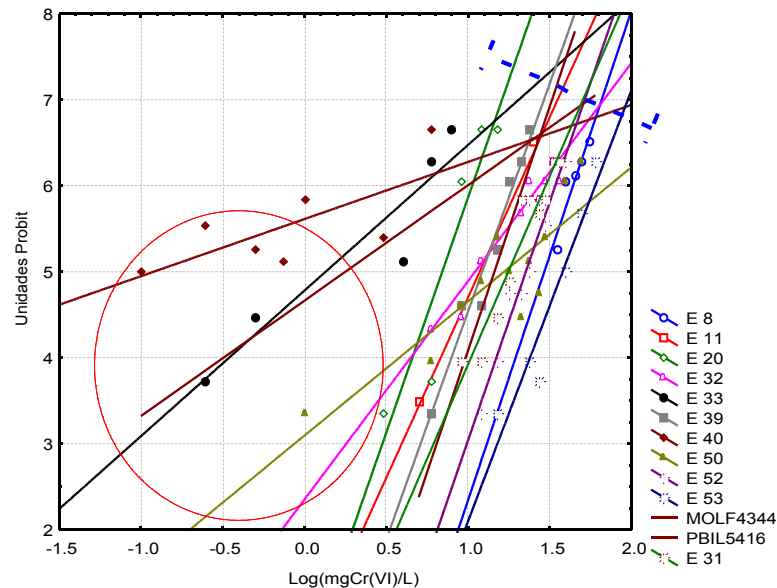
Concentración	Parámetro	N	Promedio	LCI	LCS	MIN	MAX	Rango	Desvío	C.V.	F.V.	%
LOG Conc.	0%	19	0,97	0,65	1,29	-1,00	1,68	2,68	0,72	0,74	2,00	33,25
inv LOG	0%	19	9,29	4,43	19,50	0,10	48,00	47,90	5,20	5,49	4,40	109,84
Conc.	0%	19	17,70	11,39	24,02	0,10	48,00	47,90	14,05	0,79	2,11	35,68
LOG Conc.	LC1	42	0,51	0,34	0,68	-1,13	1,56	2,69	0,57	1,12	2,03	33,96
inv LOG	LC1	42	3,22	2,17	4,80	0,07	35,91	35,83	3,72	13,27	2,21	48,80
Conc.	LC1	42	6,22	4,08	8,37	0,07	35,91	35,83	7,10	1,14	2,05	34,48
LOG Conc.	LC10	40	0,79	0,65	0,93	-0,55	1,66	2,22	0,46	0,58	1,44	18,10
inv LOG	LC10	40	6,17	4,44	8,58	0,28	46,19	45,91	2,90	3,84	1,93	39,02
Conc.	LC10	40	9,78	6,80	12,77	0,28	46,19	45,91	9,63	0,98	1,88	30,49
LOG Conc.	LC50	50	1,10	1,00	1,20	0,16	1,80	1,64	0,36	0,32	1,20	8,98
inv LOG	LC50	50	12,65	10,07	15,88	1,44	62,92	61,48	2,28	2,11	1,58	25,59
Conc.	LC50	50	17,12	13,28	20,96	1,44	62,92	61,48	13,85	0,81	1,58	22,42
LOG Conc.	LC99	36	1,72	1,62	1,82	1,05	2,22	1,16	0,31	0,18	1,13	5,92
inv LOG	LC99	36	52,26	41,35	66,06	11,28	164,19	152,91	2,05	1,52	1,60	26,39
Conc.	LC99	36	65,83	51,39	80,26	11,28	164,19	152,91	44,19	0,67	1,56	21,93
LOG Conc.	100%	21	1,69	1,50	1,88	1,00	2,68	1,68	0,44	0,26	1,25	11,20
inv LOG	100%	21	48,55	31,43	75,01	10,00	480,00	470,00	2,76	1,83	2,39	54,49
Conc.	100%	21	85,14	34,74	135,54	10,00	480,00	470,00	117,84	1,38	3,90	59,19

Referencias: N: número de ensayos contemplados para el análisis; LCI: límite de confianza inferior; LCS: límite de confianza superior; MIN: valor mínimo; MAX: valor máximo; Rango: max-min; Desvío: desviación estándar; C.V.: coeficiente de variación; F.V.: factor de variación; %: porcentaje de variación.

Tabla 12 Resultados más regresiones de las 13 curvas seleccionadas

Ensayo N°	Especie	LC-50 _{96h}	LCI	LCS	F.V.	%	X2	r2	r	p	b	a	n	Criterio	Fund.	Comp.
33	<i>S. squalirostris</i>	1,4	0,976	2,062	2,1	38	V	0,892	0,945	0,016	1,6942	4,7816	5	A	Corr.	C
PBIL5416	<i>P. biligonigerus</i>	1,8	0,070	4,657	66,5	68	V	0,634	0,796	0,002	1,3432	4,6649	12	A		C
40	<i>L. ocellatus</i>	2,0	0,070	4,156	59,4	102	V	0,520	0,721	0,067	0,6645	5,6127	7	R		I
20	<i>S. berthae</i>	7,2	6,181	8,171	1,3	14	V	0,873	0,934	0,020	5,4698	0,3956	5	A		C
8	<i>D. nanus</i>	11,0	8,130	14,830	1,8	30	V	0,874	0,935	0,020	5,6999	-3,3553	3	A		C
32	<i>B. fernandezae</i>	11,8	9,783	13,679	1,4	17	V	0,893	0,945	0,000	2,5397	2,3527	11	A		C
39	<i>S. granulatus</i>	12,2	10,812	13,524	1,3	11	V	0,963	0,981	0,000	5,3062	-0,7656	7	A	D.E.T.	C
MOL4344	<i>H. pulchellus</i>	14,5	10,595	19,768	1,9	89	V	0,929	0,964	0,000	5,6782	-1,5894	11	A		C
31	<i>B. arenarum</i>	17,8	15,980	19,665	1,2	10	V	0,917	0,958	0,000	4,3827	-0,4596	10	A		C
50	<i>X. laevis</i>	18,9	15,455	22,392	1,4	18	V	0,765	0,875	0,000	1,5611	3,0956	12	A		C
42	<i>L. latinasus</i>	19,2	14,468	22,954	1,6	22	V	0,676	0,822	0,001	2,1747	2,5695	13	R		I
52	<i>P. fernandezae</i>	21,6	19,558	23,849	1,2	10	V	0,949	0,974	0,000	5,5535	-2,5117	8	A		C
53	<i>P. fernandezae</i>	40,3	37,241	43,629	1,2	8	V	0,922	0,960	0,002	5,0195	-2,9197	6	R		I

Figura 4 Curvas de 13 ensayos realizados



En la Tabla 12 se muestran, además de los resultados obtenidos para estas 13 curvas, los parámetros de las regresiones y correlaciones para cada una de las mismas.

La variabilidad de las 13 curvas aceptadas por los criterios de selección, se ilustra en la Figura 5 (página subsiguiente), utilizando el diseño de carta control. En la Tabla 13 (página siguiente) se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico descriptivo realizado con las $\text{LC}_{50_{96h}}$ expresadas como concentración (mgCr(VI)/L) y $\text{Log}_{10}(\text{concentración})$, para las curvas seleccionadas ($n=13$), además de los mismos resultados para $n=10$ (con la sustracción de E40, E53, PBIL5416).

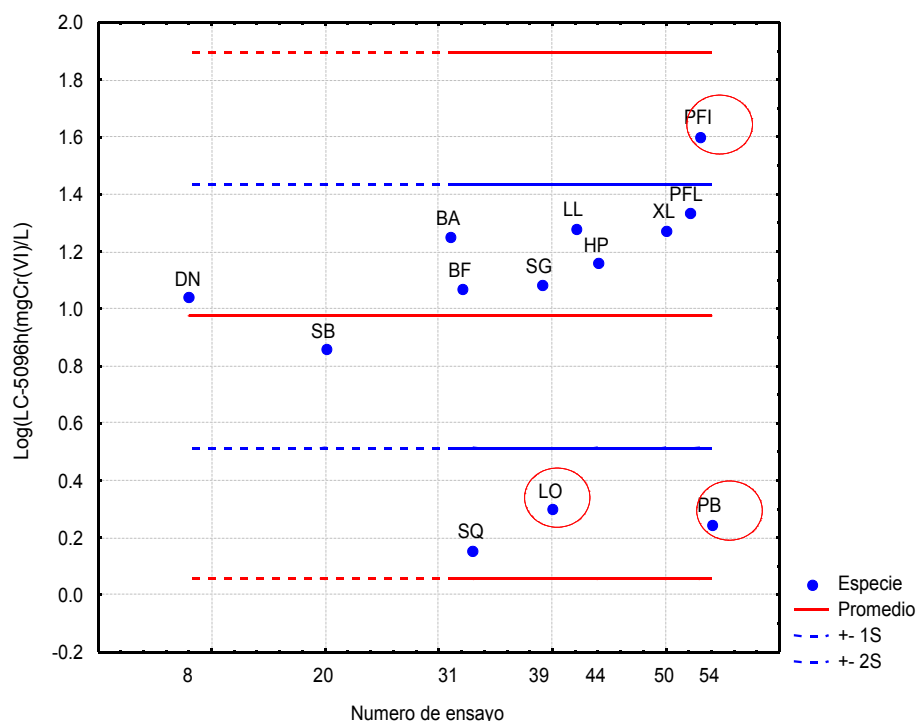
Al considerar la Figura 5 y la Tabla 13, observamos que los ensayos aceptados muestran para las 13 LC_{50} calculadas una mayor heterogeneidad, respecto a la totalidad de los ensayos mostrados en la Figura 3. Esto puede explicarse como producto de un sub-muestreo de una misma población ($n=58$), empleando una muestra más pequeña y en la que se escogieron los puntos de mayor diferencia. Dicho de otro modo, se conserva la variabilidad total (amplitud) y a su vez se disminuye el n , de 58 a 13, lo que resulta en un aumento de las medidas de dispersión (CV, FV y porcentaje de variación), en un factor de 2 veces. A pesar de ello la estimación de la $\text{LC}_{50_{96h}}$ promedio mantiene valores similares.

Tabla 13 Análisis estadístico descriptivo de las curvas D-R seleccionadas considerando n=13 y n=10

Concentración	Cuenta	Media	LCI	LCS	Mínimo	Máximo	Rango	Desvío	Niv.conf.	C.V.	F.V.	FVR	%	%R
Log (Conc)	13	0,98	0,70	1,25	0,16	1,60	1,45	0,46	0,28	0,47	1,79	10,13	28,34	64,56
Inv (LOG)	13	9,45	5,00	17,85	1,44	40,26	27,96			0,00	3,57	27,96	88,99	326,23
Conc.	13	13,83	7,47	20,18	1,44	40,26	38,82	10,52	6,36	0,76	2,70	27,96	45,98	191,20
Log (Conc)	10	1,05	0,81	1,30	0,16	1,34	1,18	0,35	0,25	0,33	1,61	8,43	23,47	26,86
Inv (LOG)	10	11,28	6,39	19,92	1,44	21,63	15,02			0,00	3,12	15,02	76,61	91,72
Conc.	10	13,57	9,15	17,99	1,44	21,63	20,19	6,18	4,42	0,46	1,97	15,02	32,56	59,37

La sustracción de las curvas E40 (LO), E53 (PF.I) y PBIL5416 (PB), indicada en la Figura 5 con círculos punteados en rojo y su posterior análisis (n=10) no muestra diferencias significativas en los resultados del análisis estadístico descriptivo respecto a los obtenidos anteriormente con n=13 (Tabla 13), por lo que se optó por no considerar esta opción y no re-dibujar la Figura 5 sin esos puntos. Este criterio se mantuvo para la comparación de las curvas en el contexto de la hipótesis filogenética en el que se emplearon las 13 curvas D-R.

Figura 5 Carta control para las 13 curvas seleccionadas



Respecto a la **Hipótesis Filogenética** que incluye la comparación de especies, los resultados de la selección de curvas D-R representativas para cada especie se mostraron en la Tabla 7. Los resultados de las estimaciones de $LC50_{96h}$ para cada curva D-R de cada especie seleccionada, además de los parámetros de la regresión, correlación y ajustes a los distintos modelos empleados, se muestran en la Tabla 12. Los resultados de la comparación de pendientes y ordenadas al origen entre estas 13 curvas, mostraron diferencias muy altamente significativas $p < 0,000001$, indicando que las curvas D-R son diferentes entre las distintas especies. En la Tabla 14 (página subsiguiente), se resumen los contrastes múltiples realizados para ambos parámetros, detallando la conclusión para cada comparación. Mientras que los resultados de la prueba de comparaciones múltiples para las pendientes y para las ordenadas al origen, se detallan por separado en las Tablas 15 y 16 (páginas subsiguientes) respectivamente.

En la Figura 4, donde se muestran las curvas D-R estimadas para las trece especies analizadas, si bien no se observa una tendencia en cuanto a las respuestas, se pueden diferenciar de la totalidad de las curvas, tres grupos (ver líneas de puntos en la figura) que responden de manera distinta entre si. Este mismo agrupamiento se obtuvo como resultado de graficar a las especies en un diagrama de dispersión tridimensional, comprendido por los parámetros de las regresiones a (en eje x) y b (en eje y) y al punto final $LC50_{96h}$, calculado a partir de cada regresión obtenida para cada especie (en eje z) (Figura 6). En esta figura se observa que se distinguen tres grupos, los que presentan distintas formas de respuesta (producto de la relación entre a y b), y se disponen, respecto al eje z, según un gradiente de sensibilidades relativas. Dentro de cada uno de estos grupos encontramos que las significancias entre las distintas especies que lo conforman no existen para ambos parámetros o son parciales (difieren en uno de los dos parámetros), y a su vez presentan diferencias significativas respecto a los otros grupos formados.

Al interpretar conjuntamente las Figuras 4, 5 y 6 y las Tablas 14, 15 y 16 (páginas siguientes), se desprende que el grupo más sensible (y el más evidente), está compuesto por LO, SS y PB especies que presentan como característica, respuestas lentas y bajas sensibilidades. Estas tres especies ya se habían distinguido como las más sensibles en la Figura 5, donde se ubican en la región comprendida entre el promedio -1 y 2 desvíos estándar, lo que corrobora su baja sensibilidad respecto a la totalidad de las especies analizadas. Existe un segundo grupo que presenta respuestas intermedias conformado por BF, LL y XL. Estas especies presentan como característica una baja velocidad de respuesta, que no termina de distinguirse claramente del grupo antes descrito, pero se diferencia del mismo por la magnitud de sus elevaciones y sus LC50 próximas al promedio obtenido para la totalidad de especies analizadas. El tercer grupo estaría conformado por el resto de las especies y tendría como característica la elevada velocidad de respuesta, presentando heterogeneidades respecto a las elevaciones y las LC50, ver figuras y tablas. Al llegar a este punto podemos concluir que los agrupamientos obtenidos a partir de la metodología propuesta, no siguen un patrón asociable a las distintas clasificaciones planteadas a modo de hipótesis (biológica, ecológica, sistemática, experimental) en el presente capítulo.

Tabla 14 Resultados de la comparación de pendientes y ordenadas al origen entre las 13 curvas

Ho	F Crítico	F	p
b1 = b2 = b3 = b4 = b5 = b6 = b7 = b8 = b9 = b10 = b11 = b12 = b13	1,869	11,05	0,00000
a1 = a2 = a3 = a4 = a5 = a6 = a7 = a8 = a9 = a10 = a11 = a12 = a13	1,854	8,80	0,00000

HIPÓTESIS	CRITERIO			HIPÓTESIS	CRITERIO		
	Pendientes	Elevaciones	Conclusión		Pendientes	Elevaciones	Conclusión
DN=SB	A	A	A	BF=PHF	A	R	R
DN=BA	A	A	A	BF=PHB	A	R	R
DN=BF	A	A	A	BF=HP	R	A	R
DN=SS	A	A	A	SS=SG	R	A	R
DN=SG	A	A	A	SS=LO	A	A	A
DN=LO	A	A	A	SS=LL	A	R	R
DN=LL	A	A	A	SS=XL	A	R	R
DN=XL	A	A	A	SS=PHF	R	R	R
DN=PHF	A	A	A	SS=PHB	R	R	R
DN=PHF	A	A	A	SS=PHB	A	A	A
DN=PHB	A	A	A	SS=HP	R	R	R
DN=HP	A	A	A	SG=LO	R	R	R
SB=BA	A	A	A	SG=LL	A	A	A
SB=BF	A	A	A	SG=XL	R	A	R
SB=SS	R	A	R	SG=PHF	A	A	A
SB=SG	A	A	A	SG=PHF	A	A	A
SB=LO	R	R	R	SG=PHB	R	R	R
SB=LL	R	A	R	SG=HP	A	A	A
SB=XL	R	A	R	LO=LL	A	R	R
SB=PHF	A	A	A	LO=XL	A	R	R
SB=PHF	A	A	A	LO=PHF	R	R	R
SB=PHB	R	A	R	LO=PHF	R	R	R
SB=HP	A	A	A	LO=PHB	A	R	R
BA=BF	A	A	A	LO=HP	R	R	R
BA=SS	A	A	A	LL=XL	A	A	A
BA=SG	A	A	A	LL=PHF	A	A	A
BA=LO	R	R	R	LL=PHF	A	A	A
BA=LL	A	A	A	LL=PHB	A	R	R
BA=XL	R	A	R	LL=HP	R	A	R
BA=PHF	A	A	A	XL=PHF	R	A	R
BA=PHF	A	A	A	XL=PHF	R	A	R
BA=PHB	R	R	R	XL=PHB	A	R	R
BA=HP	A	A	A	XL=HP	R	A	R
BF=SS	A	A	A	PHF=PHF	A	A	A
BF=SG	A	A	A	PHF=PHB	R	R	R
BF=LO	A	R	R	PHF=HP	A	A	A
BF=LL	A	A	A	PHF=PHB	R	R	R
BF=XL	A	A	A	PHF=HP	A	A	A
BF=PHF	A	A	A	PHB=HP	R	R	R

Referencias:

A = Aceptación

R = Rechazo

Especie

D. nanus
S. berthae
B. arenarum
B. fernandezae
S. squalifrostris
S. granulatus
L. ocellatus
L. latinasus
X. laevis
P. fernandezae
P. fernandezae
P. biligonigerus
H. pulchellus

Abreviatura

DN
SB
BA
BF
SS
SG
LO
LL
XL
PHF
PHF
PHB
HP

Tabla 15 Comparaciones múltiples de pendientes

Comparación de pendientes, valor crítico q.0,05, n-1, k = 4,87													
	1DN	2SB	3BA	4BF	5SS	6SG	7LO	8LL	9XL	10PHF	11PHF	12PHB	13HP
1DN													
2SB	-0,40984120												
3BA	-0,88307958	-1,40763567											
4BF	-1,68255616	-4,23598100	-2,79376504										
5SS	-2,09397941	-6,18733493	-4,68670427	-1,84025150									
6SG	-0,47896759	-0,19918565	1,16191187	3,85980320	5,65753848								
7LO	-2,55251480	-7,96671234	-6,56751914	-4,16639758	-3,31483700	-7,34781060							
8LL	-1,87861574	-5,30968182	-3,77651776	-0,77140386	1,40031843	-4,82986839	4,56956335						
9XL	-2,15503643	-6,49117277	-4,99340006	-2,18095766	-0,43117232	-5,93760178	3,04471904	-1,86723664					
10PHF	-0,36798494	0,09307341	1,33915353	3,74866013	5,25069230	0,26935625	6,70487163	4,54356166	5,48156410				
11PHF	-0,60053569	-0,53489409	0,78059753	3,35132035	5,00510887	-0,33235504	6,61934162	4,22125727	5,26401749	-0,57029442			
12PHB	-2,25683601	-7,08308774	-5,58546921	-2,83455923	-1,30702177	-6,47442822	2,69287722	-2,85490428	-0,87265379	-5,91126041	-5,75217655		
13HP	-0,32179622	0,27499907	1,77808579	4,88443145	7,19314239	0,47656408	9,18108389	6,19801041	7,55474019	0,14479756	0,82133372	8,28435077	

Referencias: En el cuerpo de la tabla se muestran los valores de q para cada comparación. En negrita se indican aquellos valores que resultaron significativos para un nivel de significancia de 0,05

Regresión	Ensayo N°	Especie	Abreviatura
1	8	<i>D. nanus</i>	DN
2	20	<i>S. berthae</i>	SB
3	31	<i>B. arenarum</i>	BA
4	32	<i>B. fernandezae</i>	BF
5	33	<i>S. squalifrostris</i>	SS
6	39	<i>S. granulatus</i>	SG
7	40	<i>L. ocellatus</i>	LO
8	42	<i>L. latinasus</i>	LL
9	50	<i>X. laevis</i>	XL
10	52	<i>P. fernandezae</i>	PHF
11	53	<i>P. fernandezae</i>	PHF
12	PBIL5416	<i>P. biligonigerus</i>	PHB
13	MOL4344	<i>H. pulchellus</i>	HP

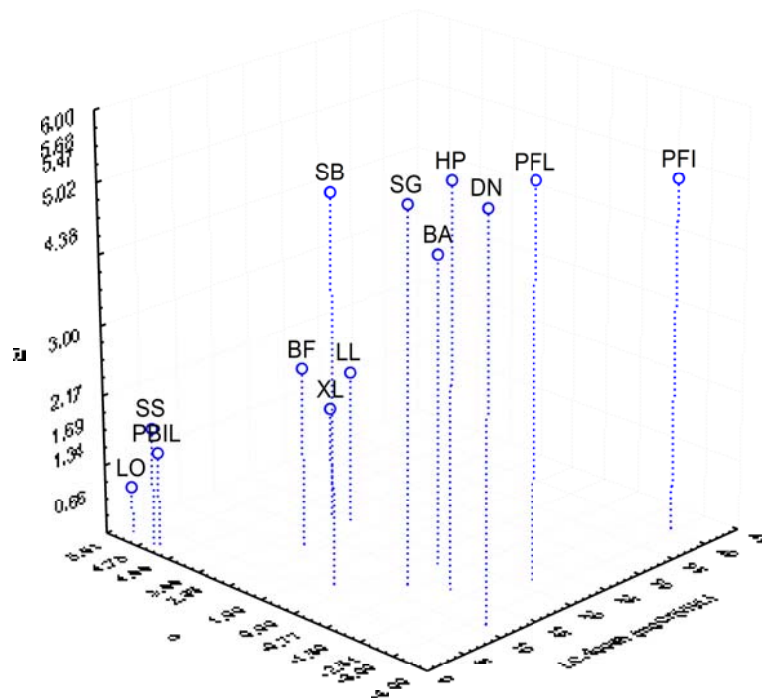
Tabla 16 Comparaciones múltiples de ordenadas al origen

Comparación de elevaciones, valor crítico q.0,05, n-1, k = 4,87													
	1DN	2SB	3BA	4BF	5SS	6SG	7LO	8LL	9XL	10PHF	11PHF	12PHB	13HP
1DN													
2SB	1,07690278												
3BA	0,04807359	2,20722161											
4BF	0,89483170	1,36004968	1,73592242										
5SS	3,28952007	3,22412975	4,63335915	4,04164916									
6SG	0,50729619	1,55246579	1,16737685	0,25799387	4,19384515								
7LO	4,60051022	5,38604515	6,20407074	5,83430559	3,55919188	5,95370418							
8LL	0,26001892	2,44903697	0,53775405	1,30622612	5,20779444	0,85218352	7,19098809						
9XL	0,37997241	3,38245945	0,52877329	2,36380927	6,26819231	1,81404538	9,08932658	1,14146177					
10PHF	0,99624174	3,01745231	1,88335103	3,51578161	5,35342790	2,56011503	6,74998157	2,46764001	1,42175420				
11PHF	2,92260152	3,72740420	3,75792523	5,11324582	6,00836386	3,67183091	7,22101777	4,47930909	3,56191590	2,11826641			
12PHB	4,06302409	3,08192001	6,10674204	4,96989517	1,34223833	5,00756213	5,53475074	6,37365494	7,54290381	7,29619227	8,31166267		
13HP	0,16620406	2,89759090	0,26875247	2,01434934	5,34912305	1,57590659	7,01622721	0,85745977	0,24395138	1,44876474	2,97259442	7,00341262	

Referencias: En el cuerpo de la tabla se muestran los valores de q para cada comparación. En negrita se indican aquellos valores que resultaron significativos para un nivel de significancia de 0,05

Regresión	Ensayo Nº	Especie	Abreviatura
1	8	<i>D. nanus</i>	DN
2	20	<i>S. berthae</i>	SB
3	31	<i>B. arenarum</i>	BA
4	32	<i>B. fernandezae</i>	BF
5	33	<i>S. squalifrostris</i>	SS
6	39	<i>S. granulatus</i>	SG
7	40	<i>L. ocellatus</i>	LO
8	42	<i>L. latinasus</i>	LL
9	50	<i>X. laevis</i>	XL
10	52	<i>P. fernandezae</i>	PHF
11	53	<i>P. fernandezae</i>	PHF
12	PBIL5416	<i>P. biligonigerus</i>	PHB
13	MOL4344	<i>H. pulchelus</i>	HP

Figura 6 Disposición de los resultados en el espacio tridimensional acotado por a , b y $LC50_{96h}$



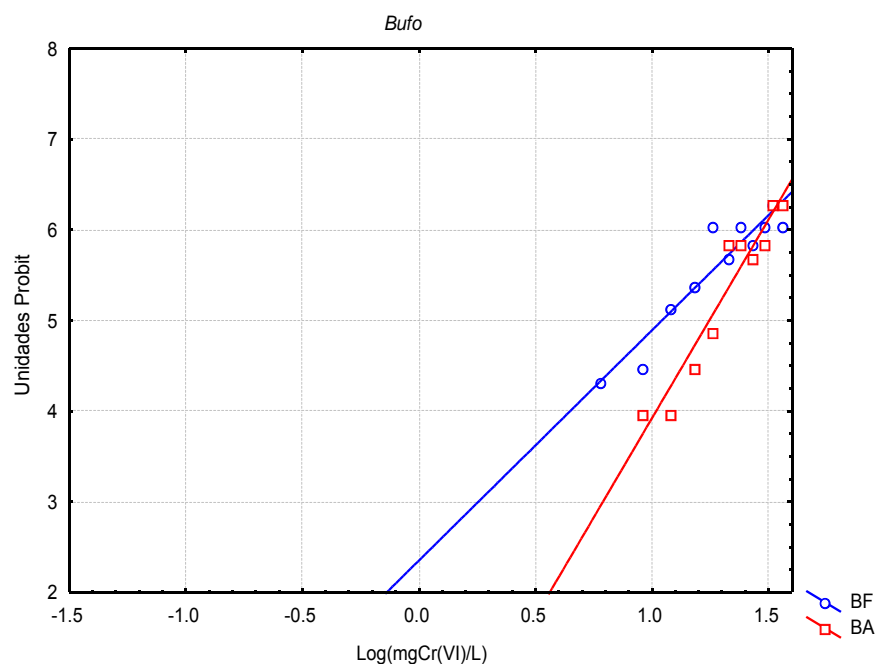
Respecto a la contrastación de la denominada **Hipótesis especie (H91a)**: “Existen diferencias entre la sensibilidad de las diferentes especies de anuros estudiados”), los resultados nos permiten concluir en favor de la aceptación de esta hipótesis, debido a que las 13 especies analizadas no responden de la misma manera a la exposición aguda al Cr(VI), presentando diferencias significativas en su sensibilidad respecto a este tóxico.

En lo que se refiere a las hipótesis que involucran a las categorías de género (**H91b**) y familia (**H91c**), en primer lugar fueron abordadas mediante la metodología propuesta realizando comparaciones entre las especies de cada género. Para esto se realizaron pruebas de significancia de comparaciones entre 2 y 2 ó más pendientes y ordenadas al origen, para las curvas: E31 (BA) y E32 (BF) del género *Bufo*; E40 (LO) y E42 (LL) del género *Leptodactylus*; E52 (PFL), E53 (PFI) y PBIL5416 (PB) del género *Physalaemus*; E20 (SB), E33 (SS) y E39 (SG) del género *Scinax* (ver Tabla 8 para más detalle).

Los resultados de la comparación (E31y E32) pertenecientes al género *Bufo*, arrojan diferencias significativas en cuanto a las pendientes y las ordenadas al origen ($p < 0,05$). En la (Figura 7, página siguiente) se observa que la curva del E32, se encuentra desplazada hacia la izquierda y posee una menor pendiente, lo que indica que las larvas del *B. fernandezae* son significativamente más sensibles

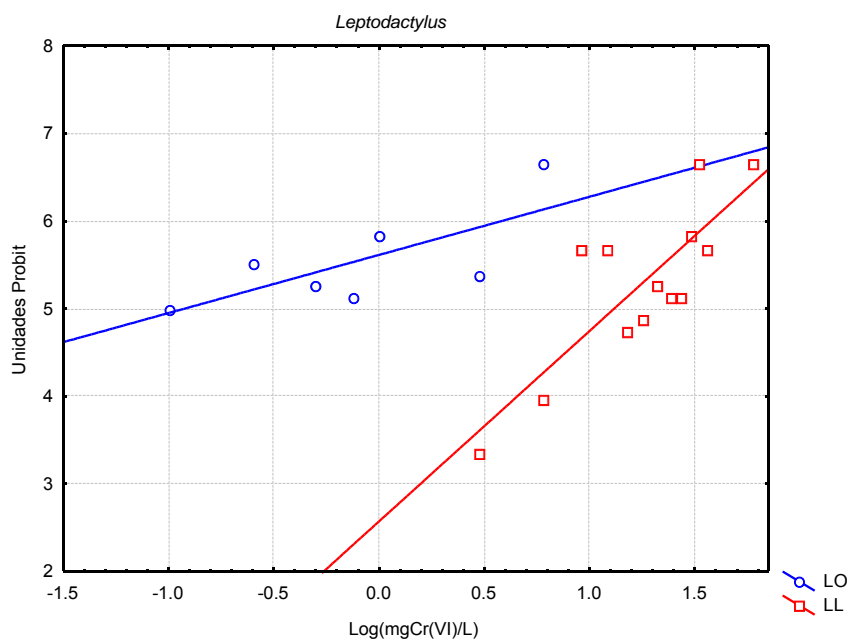
que las larvas de *Bufo arenarum*, siendo sus $LC50_{96h}$ de 11,8 y 17,8 mg Cr(VI)/L, respectivamente. La existencia de diferencias entre ambas especies, genera la imposibilidad de considerar ambas curvas como réplicas e intentar fusionarlas en una curva única “curva *Bufo*” para su posterior comparación con otras curvas de géneros mediante la metodología propuesta.

Figura 7 Comparación de curvas (E31 y E32) pertenecientes al género *Bufo*



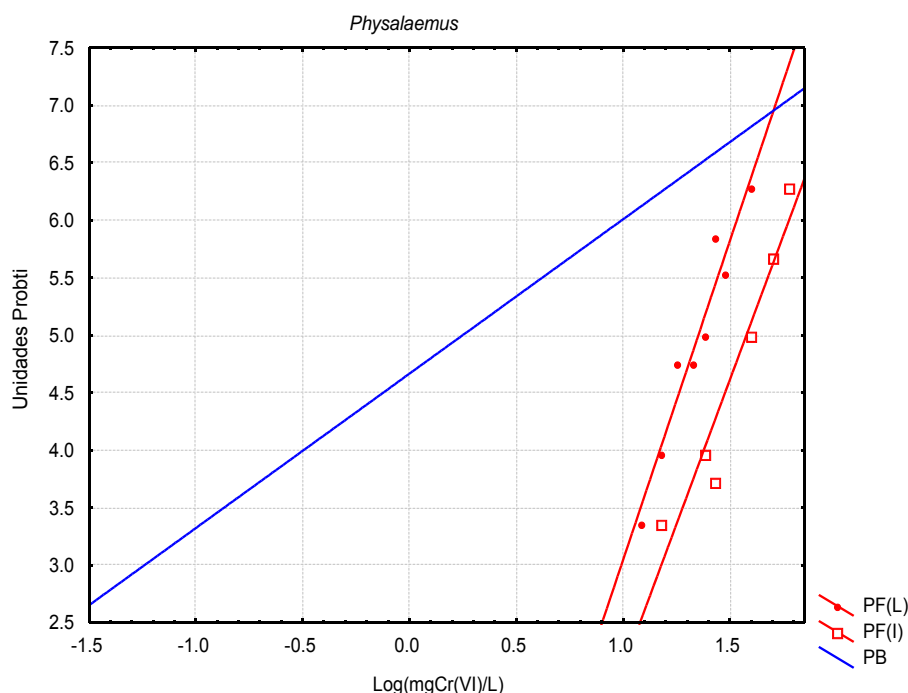
Los resultados de la comparación entre (E40-E42) pertenecientes al género *Leptodactylus*, arrojan diferencias en cuanto a las pendientes y las ordenadas al origen ($p < 0,05$), en la Figura 8 (página siguiente) se observa que la curva del E40 se encuentra desplazada hacia la izquierda y posee una menor pendiente, lo que indica que las larvas de *L. ocellatus* son significativamente más sensibles que las larvas de *L. latinasus*, siendo sus $LC50_{96h}$ de 2,0 y 19,2 mgCr(VI)/L respectivamente, difiriendo su sensibilidad en un orden de magnitud.

Figura 8 Comparación de curvas (E40-E42) pertenecientes al género *Leptodactylus*



Los resultados de la comparación entre (E52-E53 y PBIL5416) pertenecientes al género *Physalaemus*, arrojan diferencias altamente significativas en cuanto a las pendientes y las ordenadas al origen ($p < 0,0001$). En la Figura 9 de la página siguiente se observa que la curva PBIL5416 perteneciente a *P. biligonigerus*, se encuentra desplazada hacia la izquierda y posee una menor pendiente que las dos curvas pertenecientes a *P. fernandezae*, población de Punta Lara (PF.L) y población de Punta Indio (PF.I), lo que indica que las larvas de *P. biligonigerus* son significativamente más sensibles que las larvas de *P. fernandezae* de ambas poblaciones evaluadas ($p < 0,05$), (Tabla 17). Al evaluar conjuntamente estas tres curvas vemos que existen diferencias en la sensibilidad de las dos especies de *Physalaemus* difiriendo entre 12 y 22 veces, si consideramos que sus $LC50_{96h}$ son de 1,8 para *P. biligonigerus* y de 21,6 y 40,3 mgCr(VI)/L para las *P. fernandezae* de las poblaciones de Punta Lara y Punta Indio respectivamente. Si efectuamos una comparación detallada entre las dos poblaciones de *P. fernandezae*, nos encontramos con que ambas difieren significativamente en su sensibilidad, ya que si bien presentan la misma respuesta, muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) en sus elevaciones, presentando una sensibilidad dos veces mayor la población de Punta Lara.

Figura 9 Comparación de curvas (E52-E53 y PBIL5416) pertenecientes al género *Physalaemus*



Los resultados de la comparación entre (E20-E33 y E39) pertenecientes al género *Scinax*, arrojan diferencias significativas en cuanto a las pendientes y las ordenadas al origen ($p < 0,05$). En la Figura 10 (página subsiguiente) se observa que la curva E33 perteneciente a *S. squalirostris*, se encuentra desplazada hacia la izquierda y posee una menor pendiente que las curvas pertenecientes a *S. berthae* y *S. granulatus*, lo que indica que las larvas de *S. squalirostris* poseen menor sensibilidad, además de manifestar una respuesta diferente.

En la Tabla 18 (página siguiente) se presentan los resultados de las comparaciones múltiples para estas tres especies, donde se corrobora que *S. squalirostris* difiere significativamente en su pendiente de *S. berthae* y *S. granulatus* ($p < 0,05$), pero estas no difieren entre sí, presentando en principio, la misma respuesta. Al comparar las elevaciones observamos que sólo existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre *S. squalirostris* y *S. granulatus*. Estos resultados nos permiten concluir que la especie más sensible dentro del género es *S. Squalirostris*, cuya $\text{LC50}_{96\text{h}}$ es de 1,4 mgCr(VI)/L, seguida en orden decreciente de sensibilidad por *S. berthae* 7,2 mgCr(VI)/L y *S. granulatus* 12,2 mgCr(VI).

Tabla 17 Ensayo de comparaciones múltiples para *Physalaemus*

Ho	F. crítico	F	p
b1 = b2 = b3	3,493	10,490	0,0000
a1 = a2 = a3	3,440	12,350	0,0000

Comparación de pendientes, valor crítico (q.0,05, n-1,k) = 3,82			
	1 PFL	2 PFI	3 PBIL
1 PFL	0,0000		
2 PFI	0,4500	0,0000	
3 PBIL	4,7408	4,6132	0,0000

Comparación de elevaciones, valor crítico (q.0,05, n-1,k) = 3,82			
	1 PFL	2 PFI	3 PBIL
1 PFL	0,0000		
2 PFI	2,4775	0,0000	
3 PBIL	8,2420	8,3235	0,0000

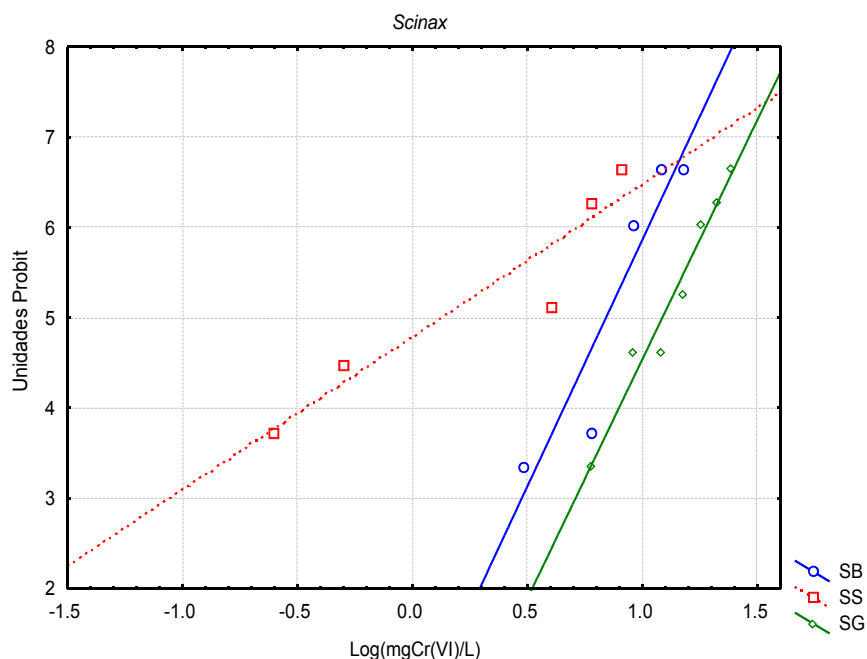
Tabla 18 Ensayo de comparaciones múltiples para *Scinax*

Ho	F. crítico	F	p
b1 = b2 = b3	3,982	14,650	0,0140
a1 = a2 = a3	3,805	5,930	0,0000

Comparación de pendientes, valor crítico (q.0,05, n-1,k) = 3,82			
	1 SB	2 SQ	3 SG
1 SB	0,0000		
2 SQ	-6,0170	0,0000	
3 SG	-0,1937	5,5010	0,0000

Comparación de elevaciones, valor crítico (q.0,05, n-1,k) = 3,82			
	1 SB	2 SQ	3 SG
1 SB	0,0000		
2 SQ	3,6290	0,0000	
3 SG	1,1714	6,2632	0,0000

Figura 10 Comparación de curvas (E20-E33 y E39) pertenecientes al género *Scinax*



Como hemos venido mencionando, los resultados presentados hasta aquí, muestran que las diferencias existentes entre las sensibilidades de las distintas especies dentro de cada género, imposibilitan su consideración como réplicas y consecuentemente su fusión en nuevas curvas D-R representativas de cada género (curva *Bufo*, *Scinax*, *Physalaemus*, etc.) para su posterior comparación por medio de la metodología propuesta. Estas diferencias entre la sensibilidad de especies dentro de cada género, también impiden la comparación por medio de pruebas paramétricas adecuadas para esta situación, como por ejemplo ANOVA de una vía. Esto mismo se presenta para el caso de la contrastación de las hipótesis planteadas para los distintos agrupamientos realizados (familia, tipo ecológico de larva, estacionalidad, hábitos de adultos), los que fueron finalmente evaluados mediante una prueba de aleatorización para ANOVA de una vía. Los resultados obtenidos de la contrastación de las hipótesis filogenéticas, mediante este análisis para el caso de género y familia, se presentan en la Tabla 19.

Los resultados de las pruebas de aleatorización para ANOVA de una vía, realizados respecto a las hipótesis filogenéticas, no muestran diferencias significativas para ninguno de los factores evaluados a un nivel de significancia de 0,05. Ello estaría indicando que la clasificación de sensibilidades de acuerdo con el criterio filogenético, no tiene sustento al considerar las sensibilidades de las especies estudiadas al Cr(VI). Esto argumentaría a favor del rechazo de las hipótesis **H9.1b**: “Existen diferencias entre la sensibilidad de los diferentes géneros de anuros estudiados” y **H9.1c**: “Existen diferencias entre la sensibilidad de las diferentes familias de anuros estudiados”, y de sus respectivas

predicciones: **Pr9.1b**: “La diferencia entre géneros es mayor que la diferencia entre especies” y **Pr9.1c**: “La diferencia entre familias es mayor que la diferencia entre géneros”

Tabla 19 Resultados de la contrastación de la Hipótesis filogenética

Fuente de variación (Factor evaluado)	Género	Familia
Número de curvas (n)	13	13
Iteraciones	1.000	1.000
Random seed	1960097331	1514158104
Índice observado	0,37451	0,47348
Promedio de los índices simulados	158.767	149.484
Varianza de los índices simulados	340.681	348.709
p(observado<=esperado)	0,183	0,315
p(observado>=esperado)	0,817	0,685

Si consideramos los resultados obtenidos y las interpretaciones realizadas hasta este punto, estamos en condiciones de concluir que existen argumentos suficientes en favor del rechazo de la hipótesis filogenética en su conjunto: **H9.1**: “Las especies más emparentadas presentarán entre sí sensibilidades más similares que las especies filogenéticamente más alejadas, respetándose las jerarquías taxonómicas reconocidas (especie, género, familia)”.

Los resultados de las hipótesis incluidas en la hipótesis ecológica, contrastados mediante la prueba de aleatorización para ANOVA de una vía se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20 Resultados de la contrastación de la Hipótesis ecológica

Fuente de variación (Factor evaluado)	Estacionalidad	Ecología	Hab. Adult.
Número de curvas (n)	13	13	13
Iteraciones	1.000	1.000	1.000
Random seed	43148690	43391520	1514158104
Índice observado	114.372	0,63252	0,47348
Promedio de los índices simulados	142.911	125.541	149.484
Varianza de los índices simulados	630.706	324.159	348.709
p(observado<=esperado)	0,711	0,52	0,315
p(observado>=esperado)	0,29	0,481	0,685

Estos resultados no muestran diferencias significativas para ninguno de los factores evaluados a un nivel de significancia de 0,05. Ello estaría indicando, al igual que los resultados obtenidos anteriormente, que la clasificación de sensibilidades de las especies dentro de estas agrupaciones (género, familia, tipo ecológico de larva, estacionalidad y hábitos adultos), no posee un sustento toxicológico. Dicho de otro modo, las distintas clasificaciones o agrupamientos propuestos (filogenético y ecológico) no mantienen una relación real con la sensibilidad de las larvas de anuros de la comunidad estudiada al Cr(VI).

Tabla 21 Resultados de las hipótesis incluidas en la hipótesis ecológica, contrastados mediante la prueba de aleatorización para ANOVA de una vía

Grupo	Especie	LC50	Birge <i>et al.</i> , 2000		Figura 6 (3D)	Normalización VT (n=58)		Normalización VT (n=13)		CONCLUSIÓN
			CHI50	CLASIFICACIÓN						
Anuros	<i>Gastrophryne carolinensis</i>	0,030	0,15789474	muy sensible		0,00237154	muy sensible	0,00317460	muy sensible	
Peces	<i>Ictalurus punctatus</i>	0,048	0,25263158	muy sensible		0,00379447	muy sensible	0,00507937	muy sensible	
Anuros	<i>Rana pipiens</i>	0,080	0,42105263	muy sensible		0,00632411	muy sensible	0,00846561	muy sensible	
Anuros	<i>Bufo fowleri</i>	0,110	0,57894737	sensible		0,00869565	muy sensible	0,01164021	muy sensible	
Peces	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,190	1,00000000	sensible		0,01501976	muy sensible	0,02010582	muy sensible	
Peces	<i>Carassius auratus</i>	0,670	3,52631579	tolerante		0,05296443	muy sensible	0,07089947	muy sensible	
Peces	<i>Micropterus salmonoides</i>	1,220	6,42105263	tolerante		0,09644269	muy sensible	0,12910053	muy sensible	
Anuros	<i>Scinax squalirostris</i>	1,440	7,57894737	tolerante	sensible	0,11383399	muy sensible	0,15238095	muy sensible	muy sensible
Anuros	<i>Physalaemus biligonigerus</i>	1,776	9,34736842	tolerante	sensible	0,14039526	muy sensible	0,18793651	muy sensible	muy sensible
Anuros	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	1,998	10,51578950	tolerante	sensible	0,15794466	muy sensible	0,21142857	muy sensible	muy sensible
Anuros	<i>Rana tigrina</i>	2,000	10,52631580	tolerante		0,15810277	muy sensible	0,21164021	muy sensible	
Urodelos	<i>Ambistoma opacum</i>	2,130	11,21052630	tolerante		0,16837945	muy sensible	0,22539683	muy sensible	
Anuros	<i>Scinax berthae</i>	7,233	38,06842110	tolerante	tolerante	0,57177866	muy sensible	0,76539683	sensible	sensible
Anuros	<i>Dendrosophus nanus</i>	10,990	57,84210530	tolerante	tolerante	0,86877470	sensible	1,16296296	tolerante	sensible
Anuros	<i>Bufo fernandezae</i>	11,772	61,95789470	tolerante	tolerante	0,93059289	sensible	1,24571429	tolerante	tolerante
Anuros	<i>Scinax granulatus</i>	12,216	64,29473680	tolerante	tolerante	0,96569170	sensible	1,29269841	tolerante	tolerante
Anuros	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	14,470	76,15789470	tolerante	tolerante	1,14387352	tolerante	1,53121693	tolerante	tolerante
Anuros	<i>Bufo arenarum</i>	17,838	93,88421050	tolerante	tolerante	1,41011858	muy tolerante	1,88761905	tolerante	tolerante
Anuros	<i>Xenopus laevis</i>	18,877	99,35263160	tolerante	tolerante	1,49225296	muy tolerante	1,99756614	tolerante	tolerante
Anuros	<i>Leptodactylus latinasus</i>	19,245	101,28947400	tolerante	tolerante	1,52134387	muy tolerante	2,03650794	tolerante	tolerante
Anuros	<i>Physalaemus fernandezae</i>	21,628	113,83157900	tolerante	muy tolerante	1,70972332	muy tolerante	2,28867725	tolerante	tolerante
Anuros	<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	30,819	162,20526300	tolerante	muy tolerante	2,43628458	muy tolerante	3,26126984	muy tolerante	muy tolerante
Anuros	<i>Physalaemus fernandezae</i>	40,300	211,91578900	tolerante	muy tolerante	3,18292490	muy tolerante	4,26074074	muy tolerante	muy tolerante
Anuros	<i>Bufo melanostictus</i>	49,290	259,42105300	tolerante		3,89644269	muy tolerante	5,21587302	muy tolerante	muy tolerante
Anuros	<i>Rana hexadactyla</i>	100,00	526,31578900	tolerante		7,90513834	muy tolerante	10,5820106	muy tolerante	muy tolerante

Estos resultados argumentan a favor del rechazo de la hipótesis ecológica (**H9.2**: “Existe una relación entre el tipo ecológico de larva y la sensibilidad al Cr(VI) en bioensayos de toxicidad aguda con larvas en STD 25”) y de sus respectivas predicciones (**Pr9.2a**: “Las larvas más nadadoras (hábitos nectónicos) poseen menor sensibilidad que las larvas de hábitos bentónicos (menos nadadoras)” y **Pr9.2b**: “Las larvas que poseen ciclos invernales poseen menor sensibilidad”).

Los resultados e interpretaciones obtenidos a partir de la contrastación de las hipótesis filogenética y ecológica, ambas contenidas en **H9**: “Existen diferencias en cuanto a la sensibilidad que presentan las larvas de las diferentes especies de una misma comunidad al Cromo (VI)”, permiten concluir a favor de la aceptación de esta hipótesis.

Por último, para las curvas D-R seleccionadas para cada especie, se categorizaron según su sensibilidad ($LC50_{96h}$ - mgCr(VI)/L -), aplicando distintos criterios (ver Tabla 21). En primer lugar se ordenaron los valores de $LC50_{96h}$ - mgCr(VI)/L obtenidos para cada especie de manera creciente y siguiendo el criterio propuesto por Birge *et al.* (2000) (**CHI**), se realizó una comparación de los resultados con la sensibilidad obtenida para trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) respecto del Cr(VI), asignándose cuatro categorías (muy sensible, sensible, tolerante y muy tolerante). Posteriormente, estas mismas categorías fueron asignadas a los conjuntos de curvas agrupadas según la Figura 6 (disposición de los resultados en el espacio tridimensional acotado por a , b y $LC50_{96h}$). Por último considerando las significancias obtenidas entre las diferentes especies a partir de los análisis realizados, se normalizaron los resultados, respecto a los valores promedios obtenidos del análisis estadístico descriptivo de la variabilidad total (Figura 3 – Tabla 11), además de realizar una normalización de los resultados respecto a valores promedios obtenidos a partir de las 13 curvas seleccionadas (Figura 5 – Tabla 13).

CAPÍTULO VI

Discusión y conclusiones

1 CONSIDERACIONES SOBRE LA BIOLOGÍA DE LOS ORGANISMOS Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN ESTUDIOS DE LABORATORIO

Teniendo en cuenta las características de la biología de las especies para el diseño de bioensayos de laboratorio y de campo, se mencionó la necesidad de conocer el período de reproducción, la estrategia reproductiva (modo de oviposición, lugar, forma, cantidad de huevos por puesta), los tiempos de eclosión, las tasas de crecimiento, desarrollo y supervivencia (relacionadas con la sensibilidad relativa), alimentación (tipo y cantidad), densidades óptimas de cría, volúmenes y superficies de agua necesarios, además de los intervalos óptimos de cría para los principales parámetros fisicoquímicos (temperatura, dureza, pH, OD, conductividad, entre otros).

Algunas de estas características actúan como limitantes para el desarrollo de experimentos controlados. Al considerar la estrategia reproductiva, es muy importante que la especie elegida sea fácil de encontrar, que sus amplexos sean visibles y localizables (que se reproduzcan en lugares accesibles). Esto, desde el punto de vista probabilístico, está relacionado con el tiempo de duración del amplexo antes de la puesta, con la abundancia de la especie en el ecosistema estudiado y con su frecuencia de reproducción. Las especies abundantes, que se reproducen por períodos prolongados (semanas) de manera continua (noche y día) y más veces en el año, tendrán más probabilidades de ser encontradas (Ej: *H. pulchellus*, *S. squalirostris*, *B. arenarum*). De la misma manera, las especies de hílidos que forman sus amplexos fuera del agua, sobre la vegetación emergente, serán más fáciles de localizar que los leptodactílidos del grupo cavícola, que forman sus amplexos en cuevas, las que a su vez se encuentran ocultas bajo troncos o disimuladas en el terreno bajo el pasto.

Existen otras limitantes asociadas con la biología, como es el caso de las especies que colocan sus huevos separadamente, dispersándolos por toda la charca (*S. granulatus*, *P. falcipes*, *O. americanus*, *C. ornata*, *P. minutus*). Las puestas de estas especies no se pueden encontrar una vez colocadas en el campo, por lo que el método de “recolección directa de puestas” no se podría aplicar. La alternativa es aplicar la “colecta de amplexos”, la “inducción artificial” o la “inducción hormonal”. En estos casos se necesitará colocar a los amplexos en terrarios o recipientes de grandes dimensiones, para aumentar la probabilidad de éxito. Una cuarta opción sería la inducción hormonal y su posterior fecundación artificial (método cruento), del que no se han encontrado en la literatura los detalles para su aplicación en la mayoría de las especies de pequeño tamaño.

Para el caso particular de las especies cuyas larvas poseen hábitos gregarios, como por ejemplo *L. ocellatus*, evidentemente existen complicaciones a la hora de aplicar la metodología aquí propuesta para evaluación de efectos agudos sobre larvas. Ello es igualmente válido para las especies que colocan sus huevos en nidos de espuma (*Leptodactylus spp.* y *Physalaemus spp.*) para la evaluación de efectos sobre embriones. En ambos casos, ya sea separando los huevos del nido de espuma, o dividiendo el cardumen, se puede aplicar la metodología propuesta, pero se desconoce el efecto que ello causaría sobre el normal desarrollo de los embriones y larvas. En principio se considera probable que existan efectos adversos sobre el normal desarrollo de estos individuos, por lo que se decidió considerarlas como limitantes a la hora de realizar experimentos controlados en laboratorio y campo.

Las tasas de crecimiento y desarrollo son también características importantes a considerar en el diseño de los experimentos, en relación a la planificación del tiempo de exposición a contaminantes, principalmente en el comienzo (tiempo que tardan en llegar al STD25) y a la finalización (tiempo en que alcanzan la metamorfosis). Existen importantes diferencias en el tiempo en alcanzar la metamorfosis, que puede variar entre 20 y 280 días, según la especie, y el tiempo que tardan en eclosionar y llegar al STD25, que podría ser casi despreciable en este sentido (entre 2 y 8 días) en comparación con el anterior.

2 CONSIDERACIONES SOBRE LA ESPECIE ELEGIDA (*Hypsiboas pulchellus*) COMO MODELO DE ESTUDIO PARA EL DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA BIOANALÍTICA

Los resultados obtenidos en el Capítulo IV nos permiten afirmar que la Contaminación por cromo afecta la fase de vida acuática de las larvas de *H. pulchellus*, ejerciendo efectos nocivos sobre los distintos estadios del desarrollo evaluados. Entre los efectos más destacados, para los intervalos de concentraciones considerados en exposiciones agudas (3 a 120 mgCr(VI)/L), se determinó para diferentes estadios del desarrollo, la inhibición de crecimiento y muerte de los individuos a las 96h respecto a los grupos control, además de otros efectos que se presentaron con frecuencia y no fueron cuantificados, como por ejemplo alteraciones en el comportamiento (natación) y distinto tipo y grado de malformaciones. Para el caso de los efectos provocados por la exposición crónica (concentraciones entre 0,001 y 12 mgCr(VI)/L), permitieron observar efectos sobre el comportamiento, crecimiento (inhibición-exaltación) y malformaciones, además de la muerte.

Por otro lado, se puede aseverar que existe una correlación positiva entre la concentración de cromo en el agua y los efectos perjudiciales que este produce sobre los renacuajos. Esto se desprende en parte de los ensayos agudos, debido a la existencia de correlaciones positivas entre la concentración de Cr(VI)mg/L

(Log de la concentración) y el porcentaje de mortalidad (unidades Probit) en cada curva D-R estimada. Además, las exposiciones a distintas concentraciones realizadas en los ensayos agudos y crónicos demuestran un aumento en el tipo de efecto conforme aumenta la concentración del tóxico: alteraciones en el comportamiento → alteraciones en las tasas de crecimiento → malformaciones → muerte.

Si consideramos las concentraciones letales (concentraciones que terminaron siendo letales para el 100% de los individuos), la exposición a cromo (VI) a concentraciones constantes tiene mayores efectos a medida que se aumenta el tiempo de exposición al que son sometidos los renacuajos. Las respuestas de los organismos de prueba a estas exposiciones se pudieron dividir en tres etapas: Una primera, hasta 96h (exposición aguda) comienza causando efectos letales en los individuos que responden rápidamente (los más sensibles), causa efectos subletales en los individuos con sensibilidad media y no se observan efectos en los individuos más resistentes. En una segunda etapa de magnitudes variables, todos los individuos muestran algún tipo de efecto subletal o letal. En la tercera etapa, se alcanza el 100% de la muerte de los individuos expuestos a esta concentración. En las concentraciones subletales (que no provocan una mortalidad significativa respecto de los grupos control), los efectos pasan de ser no observables a observables, pudiendo existir una recomposición de la respuesta, dependiendo del tiempo de exposición y en algunos casos exaltación.

Los resultados provenientes del conjunto de los ensayos de toxicidad aguda con *H. pulchellus* muestran una variabilidad que excede levemente los límites propuestos como aceptables. Ello es esperable, ya que al principio de la investigación, tal como se desarrolló en el Capítulo IV, en este análisis no se discriminaron variaciones asociadas al origen de los organismos (diferentes charcas), y otros factores modificantes bióticos y abióticos. Posteriormente, la contrastación de la consecuente hipótesis poblacional propuesta demostró la existencia de variabilidad aportada por el origen de las puestas. Es importante destacar aquí, tal como se mencionó en el Capítulo IV, que al evaluar la hipótesis poblacional, estaríamos evaluando sin poder distinguir una de otra, las hipótesis de ambiente o charca y la hipótesis genética asociada (ambas indistinguibles entre sí), además de un segundo par de hipótesis: la geográfica (las charcas elegidas están en distintas regiones geográficas) y la correspondiente hipótesis genética asociada.

La variabilidad descrita para los ensayos de toxicidad aguda con *H. pulchellus*, fue explicada y se redujo notablemente al eliminar los factores identificados como responsables de generar dicha variabilidad, mostrando entre los grupos de ensayos comparables una disminución de la variabilidad que llegó a límites aceptables, y una mayor repetitividad de resultados al aplicar la metodología de ensayo propuesta. Esto brinda argumentos a favor de proponer a los ensayos de toxicidad aguda con larvas de *H. pulchellus* como adecuados para el desarrollo de una herramienta bioanalítica. Fue en este sentido que se identificó y corroboró la influencia de distintos factores modificantes, sobre la variabilidad de respuesta en ensayos de laboratorio. Entre los factores modificantes bióticos podemos mencionar como significativos, al origen de las puestas dentro de una misma especie

(diferentes sitios reproductivos) y a la estacionalidad o época del año en que una determinada población se reproduce en un sitio reproductivo determinado. Entre los factores modificantes abióticos, podemos mencionar a la dureza del agua de ensayo relacionada inversamente con la sensibilidad, a la estaticidad de la exposición (corroborando que la ausencia de renovación del medio se relaciona con un aumento de la mortalidad de los organismos de prueba), y al uso de agua de red reposada y debidamente aireada como agua de ensayo, la que no presenta diferencias con la utilización de agua reconstituida según el protocolo estandarizado FETAX.

Respecto a la comparación de *H. pulchellus* con *X. laevis*, especie de referencia propuesta por FETAX como organismo diagnóstico en procedimiento estandarizado, los resultados muestran que la especie estudiada posee una sensibilidad menor para las pruebas realizadas con ambas especies bajo la metodología propuesta en el presente estudio. Sin embargo, al comparar la respuesta de *H. pulchellus* con agua de metodología propuesta y con la obtenida en agua de la metodología estandarizada por FETAX, no se encontraron diferencias significativas entre las mismas. Teniendo en cuenta estos resultados, además del interés de realizar evaluaciones regionales con especies nativas como sustitutos de las utilizadas en procedimientos estandarizados para otras latitudes, consideramos que se aportan fundamentos para proponer a *H. pulchellus* como una posible especie para el desarrollo de herramientas bioanalíticas estandarizadas de interés regional.

A la hora de realizar una selección de especies de anuros regionales más convenientes para su utilización en bioensayos de toxicidad y analizar su posible uso como especie diagnóstico, además de las consideraciones sugeridas por los organismos internacionales (U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), American Society for Testing and Materials (ASTM), Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Environmental Canada), desarrolladas en el Capítulo I, se tomaron en cuenta una serie de características relacionadas con el manejo y obtención de los organismos, se seleccionaron especies teniendo en cuenta la facilidad de ser halladas en el ambiente, la frecuencia de reproducción y la viabilidad y éxito de la reproducción artificial, además de facilidad de cría y desarrollo en condiciones de laboratorio, lo que implica especies con tasas de supervivencia altas, redundando en un mejor manejo, sin descontar la sensibilidad relativa a la contaminación.

Estos elementos, para el caso particular de los estudios con cromo realizados en el presente trabajo de tesis, determinaron la selección no sólo de las especies significativamente más sensibles que el resto, sino de aquellas especies que cumplieron con todos los puntos considerados. El caso de la elección de *H. pulchellus*, se encuentra relacionado en parte con la cantidad de información que se pudo generar con esta especie.

3 CONSIDERACIONES SOBRE LA SENSIBILIDAD DE *H. pulchellus* AL CROMO DURANTE EL CICLO DE VIDA LARVAL

Teniendo en cuenta las consideraciones desarrolladas en el Capítulo IV referidas a la hipótesis conjunta Desarrollo, Edad, Tamaño (**DET**), se pudo observar que en los ensayos de toxicidad aguda la relación entre la sensibilidad ($LC_{50_{96h}}$) y el tiempo (desarrollo, edad y tamaño) presentan forma parabólica. La Figura 28 (del mencionado Capítulo) muestra que los renacuajos de *H. pulchellus* aumentan su sensibilidad a Cr(VI) progresivamente durante las primeras 400 horas de vida, con su etapa más sensible entre 450 y 700 horas, para luego estabilizarse y disminuir conforme aumenta su edad, tamaño y desarrollo, soportando la idea de que existe una etapa más sensible en el desarrollo de las larvas en un intervalo de edad determinado.

Al considerar los resultados obtenidos en los ensayos crónicos, se observa una tendencia similar. Se observó experimentalmente que los grupos de edad a lo largo del período de exposición crónica manifiestan un patrón de máxima sensibilidad entre las 380 y 780 h. Este tipo de resultado puede explicarse por la vía de la adaptación de los sobrevivientes, de acuerdo con el síndrome general de adaptación propuesto por Seyle (1973) (ver Figura 1). Este fenómeno puede también explicar otros puntos finales como la inhibición del crecimiento, que se puede interpretar como la utilización de la energía destinada originalmente al crecimiento, para revertir una situación fisiológicamente estresante, que de no ser superada llevaría a la muerte de los individuos, y que de ser superada, conllevaría una adaptación establecida, al encontrar un nuevo equilibrio u homeostasis.

Estos antecedentes aportan los fundamentos para afirmar que en las condiciones de ensayo practicadas, tanto en exposiciones agudas como crónicas, el período de vida más sensible esta comprendido entre los períodos antes mencionados.

Otra posible explicación al fenómeno antes observado, podría estar asociada al hecho de que los renacuajos en condiciones de laboratorio podrían debilitarse por alguna causa y que la disminución en la sensibilidad y su posterior aumento, fuera debida a la aclimatación. Se deduciría entonces que el tiempo de aclimatación en laboratorio sería de aproximadamente 600 horas. Si esto fuera así, entre las posibles causas del debilitamiento de los organismos de prueba, se puede proponer como causa principal el cambio en la alimentación. Los renacuajos luego de agotar sus reservas de energía embrionarias (vitelo), comienzan a alimentarse activamente y se encuentran con una nueva fuente de energía con propiedades muy diferentes (lechuga licuada). Esta alternativa permite imaginar futuros objetivos de investigación, tales como el de evaluar en campo las tasas de supervivencia a lo largo del ciclo de vida, como una manera de validar o confirmar la tendencia observada. En laboratorio se deberían realizar ensayos en detalle con los estadios extremos, huevos, embriones y renacuajos de estadios avanzados y en crisis metamórfica, reforzando de esta manera la información respecto a la sensibilidad de los renacuajos en las distintas etapas de su desarrollo, con el

objetivo de determinar cuál es la etapa más sensible del desarrollo o estadio de vida crítico (CLS). Por otra parte, se deberían realizar diseños experimentales, utilizando variables de respuesta que reflejen el estado nutricional de los organismos de prueba a lo largo del desarrollo larval, tanto en campo como en laboratorio.

Figura 1 Los tres estadios del síndrome general de adaptación (GAS) (Seyle, 1973)

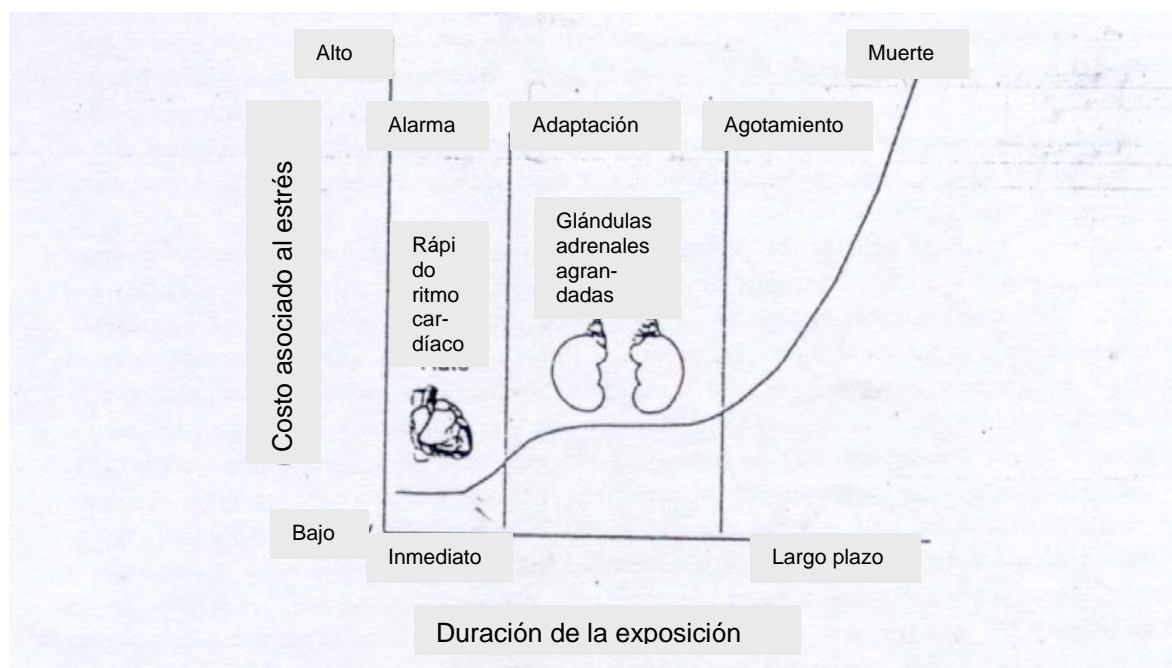


Figura 8.1 Los tres estadios del síndrome general de adaptación (GAS). En la fase inicial de alarma, las respuestas inmediatas al estrés incluyen aumento de la presión sanguínea y de los latidos cardíacos. Las células del córtex adrenal también descargan sus gránulos en la sangre. En prolongados períodos de exposición, ocurre un agrandamiento del adrenal y las células del córtex pueden tornarse ricas en gránulos nuevamente (Seyle, 1973). Finalmente, luego de una exposición suficiente, es excedida la capacidad del cuerpo para compensar los efectos del estresante, y el individuo lentamente queda exhausto. Si el estrés continúa, el individuo morirá.

Al considerar los resultados obtenidos de los organismos expuestos al Cr(VI) desde embriones en exposiciones crónicas, de manera similar que los resultados obtenidos en exposiciones agudas, se observa que los embriones muestran menor mortalidad que aquellos expuestos desde larvas. Ello indica que aunque haya una exposición más extensa en el grupo embrionario en comparación con el larval, el primero presenta mayor supervivencia, señalando algún tipo de adaptación a la exposición a concentraciones subletales de Cr(VI) en este estadio. Esta adaptación estaría asociada con la existencia de procesos bioquímicos y fisiológicos que se expresarían en una mejor performance (menor mortalidad, mayor crecimiento) respecto a las larvas. Esto quizá, como mencionamos anteriormente, se puede interpretar simplemente como una aclimatación de los individuos a las condiciones iniciales. Esta aclimatación no sería experimentada por las larvas, las

que por el contrario serían cambiadas abruptamente de medio (respecto al Cr(VI). Si asumimos esta diferencia en la exposición, estamos aceptando que habría existido un contacto del embrión con el medio a través de las membranas, ya que si las membranas no hubieran sido permeables al tóxico, no esperaríamos encontrar diferencias.

Figura 2 Esquema generalizado de un huevo de anfibio

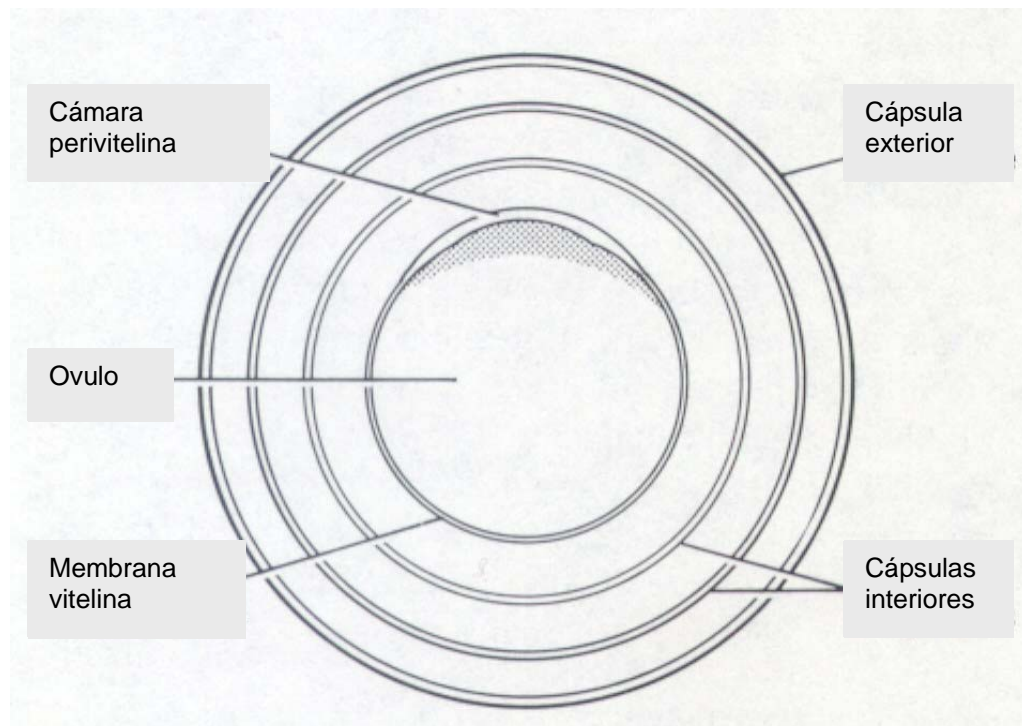


Figura 5-3. Esquema generalizado de huevo de anfibio mostrando membranas y cápsulas. Las cápsulas mucosas varían en número, espesor y viscosidad.

Al parecer, la envoltura del huevo, compuesta por una serie de cápsulas mucosas concéntricas que circundan el óvulo y la membrana vitelina, protege al embrión en desarrollo, y actúa como una barrera que demora la exposición al tóxico (ver Figura 2). Sin embargo, se ha informado que la membrana permanece permeable y que está sujeta al transporte activo y pasivo de los productos químicos a lo largo de su desarrollo (Westerman, 1977; Duellman y Trueb, 1994; Birge *et al.*, 2000). El influjo osmótico durante la imbibición debe ser uno de los períodos químicamente más susceptibles para el huevo debido a la relativamente alta permeabilidad de las cápsulas en ese momento (Westerman, 1977; Duellman y Trueb, 1994). Birge *et al.* (2000) asumieron que la concentración de un determinado producto químico en el medio circundante está en equilibrio con la concentración en los huevos. No se sabe si los químicos se trasladan desde el ambiente a través de las envolturas y dentro del embrión o si aquéllas proporcionan alguna protección al mismo. Los

resultados presentes indican que los embriones estuvieron expuestos al Cr(VI) a pesar de las capas y la cubierta gelatinosa que envuelven al huevo. También se muestra que fue necesaria una concentración tres veces mayor en el medio para alcanzar el efecto equivalente en la mortalidad cuando se lo compara con las larvas. De todos modos, no podemos asegurar si los embriones son más resistentes que las larvas o si hubo una menor exposición asociada con una acción protectora de cualquiera de las capas del huevo.

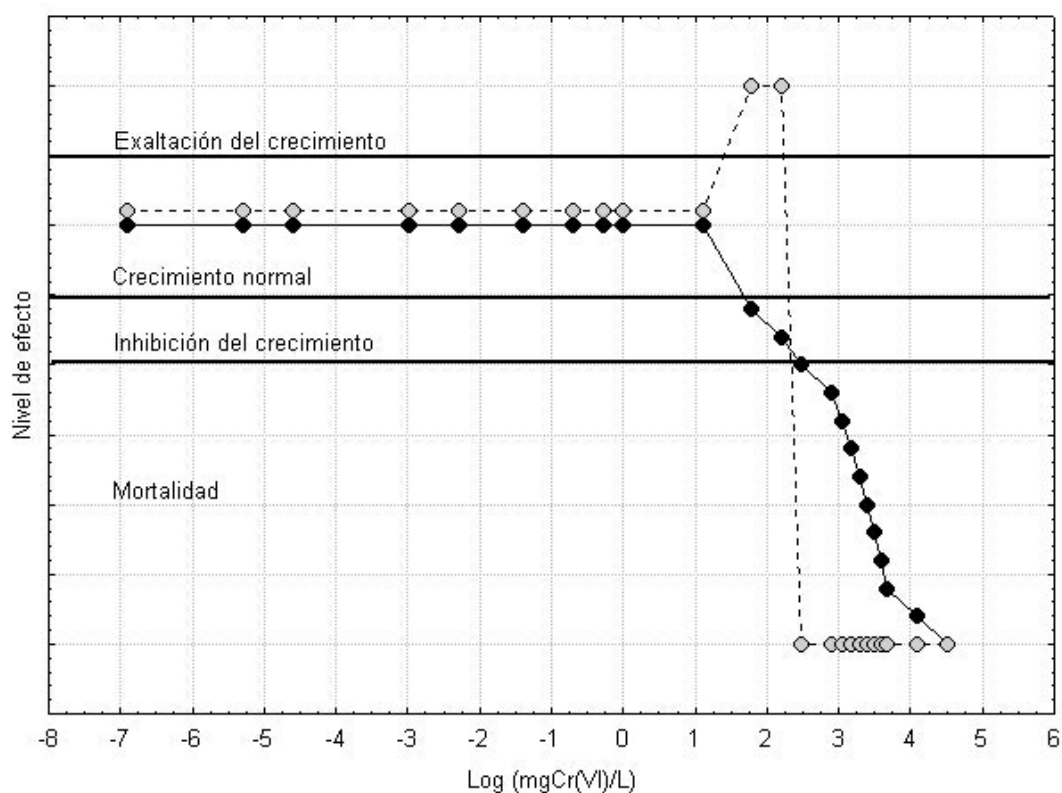
Como se mencionó anteriormente, respecto a la sensibilidad de *H. pulchellus* en función del estadio de desarrollo, los resultados determinaron un período crítico del desarrollo larval entre 380 y 780 h. Según las estimaciones establecidas entre la edad, crecimiento y desarrollo (Capítulo III “Estudios bioecológicos”) este intervalo comprendería larvas de estadios entre 25 y 28. Es importante mencionar que la variabilidad de las tasas de desarrollo de las larvas de *H. pulchellus* es muy elevada, pudiendo permanecer según nuestros registros, en estadio 25 entre 120 y hasta 1920 h de edad (80 días) y alcanzar el estadio 46 (fin de la metamorfosis) en un mes (720 h – 30 días). De ello se deduce que la predicción **Pr4d** (enunciada en el Capítulo IV), que intenta predecir el estadio de vida crítico (CLS), estaría formulada de manera poco precisa: “En las larvas de *H. pulchellus* el estadio de vida crítico es el STD 25”, ya que según los resultados obtenidos, el STD 25 podría o no ser seleccionado como el estadio de vida crítico. Esta predicción se formuló en referencia a un STD 25 incipiente, de 120-180 h de edad (ver metodología propuesta). Por esta razón, argumentaríamos en contra de la hipótesis, debido a que el CLS determinado, asociado con el intervalo de edad considerado entre 380 y 780 h, sería un STD 25 avanzado o un STD 28.

Por otra parte, cuando se analizan los efectos en el crecimiento como producto de las exposiciones a concentraciones subletales al Cr(VI), se observa que los organismos expuestos desde el estadio embrionario muestran una tasa más alta de crecimiento, evidenciando el mismo tipo de adaptación a la exposición a concentraciones subletales de Cr(VI). Sin embargo, del análisis de las comparaciones diarias de crecimiento, se desprende que el grupo de edad embrionario muestra durante las cinco primeras semanas (784 h) mayores tasas de crecimiento que el grupo de edad larvas. Estas diferencias no son detectadas para ambos grupos de edad luego de estas cinco semanas de exposición hasta el final del experimento. Es importante destacar aquí, el particular comportamiento de respuesta a las concentraciones de Cr(VI) subletales más elevadas ensayadas.

Al considerar el grupo de edad larvas, se observó entre las 280 y 784 h de exposición, un comportamiento de respuesta esperado (una inhibición del crecimiento significativamente diferente respecto de los controles), aunque seguido de un crecimiento inusual (incremento de la tasa de crecimiento luego de 448 h de exposición), produciendo organismos mayores que los grupos control luego de 952 h. Esta misma respuesta se observó también aumentada en el grupo de edad de embriones (ver figuras 37 y 38 del Capítulo IV). La respuesta compensatoria a bajas concentraciones del tóxico (como la observada luego de 448 h de exposición) ha sido documentada para otros anfibios, peces y otros organismos

(Sprague, 1971). Durante este proceso, las diferencias de crecimiento en el período inicial de exposición están compensadas por un aumento en la tasa de crecimiento (Newman y Unger, 2002). Esta observación se corresponde con un comportamiento de tipo hormético durante la exposición prolongada a concentraciones subletales de Cr(VI) para *H. pulchellus*. Esta respuesta se resume en la Figura 3, donde se observa para las concentraciones más bajas que muestran efecto (LOEC), respuestas disímiles respecto al nivel de efecto observado, según la etapa de desarrollo al momento de la exposición, tal como se describió anteriormente.

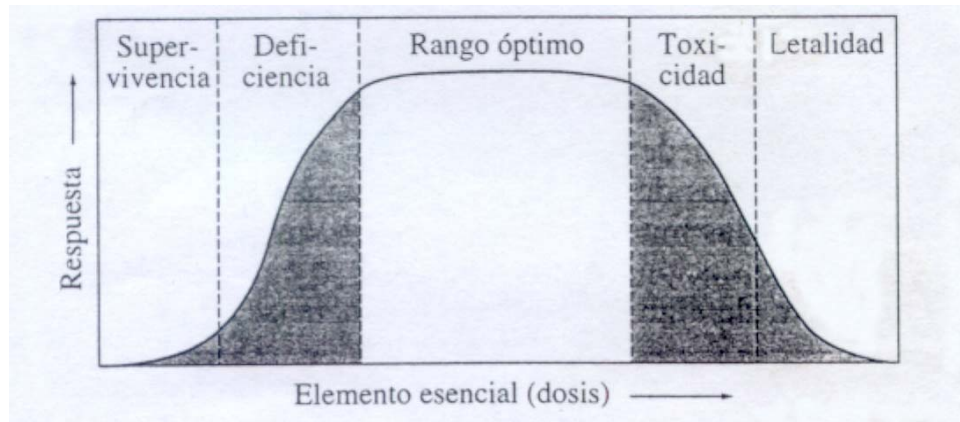
Figura 3 Esquema simplificado que muestra la variación en la respuesta de renacuajos de *H.pulchellus* al Cr(VI) expuestos durante los primeros días de edad (14-25 días) (mostrados con círculos claros y línea punteada), y expuestos hacia la finalización del experimento (45-53 días) (mostrados con círculos negros y línea continua)



Por otra parte, este comportamiento recuerda el observado en el diagrama de Bertrand (Baran, 1995), que explica el efecto de la dosis de un elemento esencial sobre la respuesta fisiológica en 5 etapas. Etapa 1: supervivencia, en la que el organismo sobrevive a medida que las concentraciones aumentan, sin problemas. Etapa 2: deficiencia, en la que el individuo está mejor fisiológicamente, pero no puede llevar adelante con máxima eficiencia los procesos “controlados” por este elemento. Etapa 3: intervalo óptimo, dentro del cual los procesos fisiológicos ocurren de manera óptima debido a la abundancia justa del elemento en cuestión.

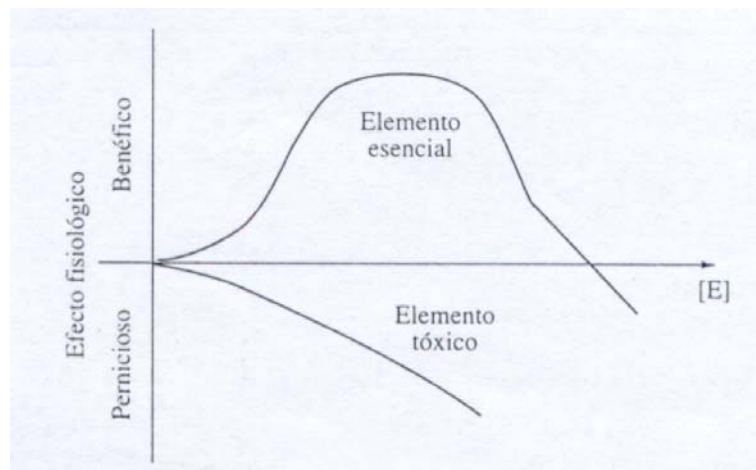
Etapa 4: toxicidad, donde el aumento de las concentraciones del elemento comienza a tener efectos negativos. Etapa 5: letalidad, en donde las elevadas concentraciones del elemento ya produce desequilibrios tales que llevan a la muerte del individuo (Figura 4).

Figura 4 Efecto de la dosis de un elemento esencial sobre la respuesta fisiológica (Diagrama de Bertrand)



La Figura 5 presenta un diagrama alternativo que muestra el efecto fisiológico (pernicioso/benéfico) comparando dos elementos, uno esencial y otro tóxico, donde puede observarse que el elemento esencial cumple con todas las etapas mencionadas para el diagrama de Bertrand, y por el contrario el elemento tóxico tiene sólo efectos perniciosos. Este diagrama posee cierta similitud con la tendencia mostrada en la Figura 3, lo que podría estar brindando un indicio de que el cromo a bajas concentraciones es esencial para el crecimiento de los renacuajos.

Figura 5 Comparación del efecto de la dosis de un elemento esencial y de un elemento tóxico sobre la respuesta fisiológica



4 ALGUNAS CONSIDERACIONES DESDE EL PUNTO DE VISTA DE LA ECOLOGÍA LARVAL

En la naturaleza, el tiempo en que las larvas alcanzan la metamorfosis es un factor importante, relacionado con la supervivencia individual del adulto. Las tasas de desarrollo larval y consecuentemente el tiempo en el que las larvas alcanzan la metamorfosis están condicionadas por los factores ambientales e interacciones ecológicas que sufren los huevos, embriones y larvas, como se resume en la Figura 1 del Capítulo IV.

Según Alford (1999), los renacuajos pueden determinar la tasa de desarrollo de acuerdo a los parámetros ambientales. Las condiciones favorables se pueden corresponder con tasas bajas de desarrollo permitiendo un mejor uso de esas condiciones. Por el contrario, las condiciones desfavorables pueden desencadenar una alta tasa de desarrollo, permitiendo impedir impactos no deseados. Wilbur y Collins (1973), Smith-Gill y Berven (1979) y Travis *et al.* (1987) argumentaron que la tasa de crecimiento es una importante medida del estado de los individuos en cualquier ambiente y sugirieron por lo tanto que es una medida válida de la habilidad competitiva. Los individuos que crecen rápido son los ganadores de la competición; los que crecen lento son los perdedores. El crecimiento lento de las larvas incrementa el riesgo de predación e incrementa el riesgo de muerte por desecamiento del charco (Wilbur 1987, Newman 1989).

Las larvas de anuros poseen como característica una plasticidad adaptativa, que les permite variar sus tasas de desarrollo ante las diferentes condiciones que se presentan en el medio, acortando el tiempo en alcanzar la metamorfosis y escapando del charco ante condiciones desfavorables (Newman, 1992). Vemos claramente que éstas pueden actuar como una ventaja potencial de la especie por encima de los factores que afectan el normal desarrollo de los anuros. Esta respuesta (aumento de la tasa de desarrollo y máxima supervivencia larval) al momento de su huida o escape ante condiciones desfavorables del ambiente acuático posee un costo asociado. La precitada metamorfosis (Shi 2000) frecuentemente resulta en un tamaño pequeño, que reduce la performance del adulto (Smith 1987, Semlitsch *et al.* 1988; Newman 1998). Otros autores también mencionan una regla que asume que la metamorfosis al producirse con un tamaño muy pequeño menoscabaría el desempeño terrestre (Pough y Kamel, 1984; Emerson, 1986). Hayes *et al.*, (1993) proponen que la metamorfosis prematura resulta probablemente en animales juveniles pequeños, los que disminuyen su supervivencia como resultado de su vulnerabilidad a los predadores, y a que su habilidad de atrapar elementos alimentarios grandes se ve disminuida, limitándose así sus recursos energéticos (Hayes, 2000). Por el contrario, de acuerdo a Smith (1987), la metamorfosis alcanzada con grandes tamaños se relaciona positivamente con la supervivencia de los adultos y su futura adaptación.

Si quisiéramos argumentar desde el punto de vista de la ecología larval a favor de la existencia de un efecto benéfico del Cr(VI) en los renacuajos expuestos desde

el estadio de huevo a concentraciones efectivamente altas de tóxico, deberíamos esperar que con las condiciones óptimas del medio, además de acelerar las tasas de crecimiento, alcanzarán la metamorfosis antes y con un tamaño mayor en comparación con el grupo de control. Sin embargo, en nuestros experimentos el análisis estadístico realizado sobre la variable “estadio de desarrollo al momento de la primera metamorfosis” (día 53), no mostró diferencias significativas entre los grupos, lo que en principio está indicando tasas de desarrollo similares en ambos grupos. Dicho de otro modo, ausencia de efecto de los tratamientos sobre las tasas de desarrollo. Los individuos expuestos a concentraciones altas subletales de Cr(VI) no aumentaron su tasa de desarrollo como respuesta al estrés, sino que habiendo alcanzado el tamaño mínimo para la metamorfosis, metamorfosearon (Wilbur y Collins, 1973; Travis, 1984; Hensley, 1993). Teniendo en cuenta los tempranos hallazgos de Hensley (1993) y Beck (1997), los resultados obtenidos sugieren, de mantenerse esta tendencia, que las tasas de desarrollo y en consecuencia la edad al momento de la metamorfosis, estaría determinada muy tempranamente en el desarrollo embrionario. Los resultados de este estudio permiten aseverar que, independientemente del tiempo en el cual los renacuajos fijan su tasa de desarrollo, éstos tienen la capacidad de modificar la tasa de crecimiento.

Si consideramos las hipótesis que proponen el aumento de las tasas de crecimiento como un aumento en la habilidad competitiva y al aumento de tamaño en la metamorfosis como una ventaja adaptativa, podríamos considerar a las respuestas a las exposiciones subletales altas de cromo, observadas en los experimentos crónicos, como una respuesta favorable al estrés, ya que en ambos experimentos realizados, se observó la misma tendencia, los renacuajos (expuestos desde huevos o larvas) respondieron acelerando la tasa de crecimiento en presencia de altas concentraciones subletales de cromo, lo que llevó a que los renacuajos alcanzaran un tamaño mayor, y metamorfosearan antes de tiempo que los demás grupos (los expuestos a concentraciones que no indujeron efectos detectables y los grupos control). Ello estaría sugiriendo según los autores antes mencionados, un posible aumento en la supervivencia larval, además de una mejor performance luego de la metamorfosis. Siguiendo este razonamiento podría especularse que en ambientes estables, tales como aquellos donde la especie se reproduce, con un exceso de disponibilidad de alimento (ambientes eutróficos), los disturbios debidos a las concentraciones subletales de tóxicos podrían favorecer la adecuación de la especie.

5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS ECOTOXICOLÓGICOS

Incorporando estas interpretaciones ecológicas a los esquemas de la toxicología acuática, podríamos considerar estas dos explicaciones:

1) Los renacuajos que sobreviven escapan de la situación desfavorable, debido a que el tóxico es nocivo y los terminará matando. Esta explicación además de ser de característica antropocéntrica, no sería la hipótesis más parsimoniosa. Estaríamos involucrando, además de un mecanismo de detección de condiciones desfavorables por parte de las larvas, otras dos hipótesis: la de la existencia de un valor de tolerancia límite (IED), y por otro lado que el Cromo se bioacumula, ya que para llegar a este umbral la concentración debería ir aumentando; de otro modo nunca alcanzaría dicho umbral

2) Los renacuajos que sobreviven ya no morirían (son tolerantes), aclimatándose a esta condición. En este caso la explicación no sería la huida de las condiciones desfavorables, sino que el cromo presente en el agua a esas concentraciones dispararía algún tipo de mecanismo bioquímico o fisiológico que se expresa en un aumento de la tasa de crecimiento.

Esta misma explicación argumentaría: a) a favor de la existencia de algún mecanismo de detoxificación o eliminación de cromo, el cual evitaría la bioacumulación continua (incremento del factor de bioacumulación) alcanzando el valor de tolerancia umbral para el individuo. b) a la ausencia de control fisiológico del tóxico y ausencia de bioacumulación, por lo que no se alcanzará el umbral de tolerancia individual, siendo los individuos tolerantes innatos a esta condición.

La plasticidad adaptativa, estaría dada solamente en los estadios larvales de vida libre, considerados como renacuajos propiamente dichos, comprendidos entre los STD 26 y 41. En otros momentos del desarrollo, aquellos comprendidos entre los estadios 0 y 19 (desarrollo embrionario) o entre los estadios 19 y 25 (período de eclosión) y posteriormente durante la crisis metamórfica (a partir del estadio 42), se esperaría que debido al gran número y complejidad de procesos bioquímicos y fisiológicos que se dan en estas etapas, a modo de “cascadas” o “cadenas” (reacciones secuenciales donde cada paso sólo es posible si los precedentes se dieron en el orden adecuado), los embriones y los organismos en crisis metamórfica carecerían de la plasticidad presente en los estadios larvales típicos, por lo que la exposición de esos individuos a condiciones estresantes (desfavorables) causaría la ausencia de plasticidad.

Teniendo en cuenta los hallazgos realizados, la selección del momento de la primera metamorfosis (1272 h de exposición) como tiempo de exposición crónica, aporta una apreciación diferente y opuesta a lo esperable cuando se la compara con los efectos detectados en períodos más tempranos, según proponen distintos procedimientos estandarizados, AMPHICHRO (Herkovitz y Pérez-Coll, 1999 a,b) u otros criterios de ensayo más breves de cronicidad (USEPA, 1989).

6 CONSIDERACIONES SOBRE EL ESTUDIO ECOTOXICOLÓGICO DE UNA TAXOCOMUNIDAD DE ANUROS

En lo referente a la sensibilidad interespecífica se lograron observar diferencias en cuanto a la sensibilidad que presentaban las larvas de las diferentes especies de una misma comunidad al cromo (VI). Las diferencias encontradas entre las diversas especies no siguen un patrón identificable desde los puntos de vista sistemático y ecológico analizados.

Respecto a las comparaciones entre la sensibilidad de distintas especies al cromo, al igual que a otros contaminantes, las dificultades se encuentran en que, si bien existe una metodología de análisis específico como lo es el análisis probit, no se han desarrollado otras herramientas simples que permitan la comparación entre los parámetros toxicológicos más utilizados (por ejemplo LC50). La metodología estadística convencional aplicada para resolver este tipo de situaciones, requiere (en el caso de que la variable estudiada sea: la sensibilidad expresada como LC50_{96h}) un mínimo de tres datos (LC50) por grupo a comparar (un test de “t” para diferencia de medias), siendo este el caso más simple que puede presentarse. Como supuestos para abordar esta comparación se pretende que los datos sean mínimamente comparables; dicho de otro modo, que la variable haya sido originada con una misma metodología, y en el mejor de los casos de un mismo experimento. Al analizar las introducciones teóricas desarrolladas en los Capítulos I y IV, se puede visualizar que luego de haberse generado la herramienta estadística para estimar la potencia de sustancias tóxicas en bioensayos de toxicidad, se originó una considerable producción de datos aislados sobre un sinnúmero de sustancias químicas, para diferentes especies pertenecientes a distintas categorías taxonómicas. Las mismas carecen de repeticiones o no siguen los lineamientos de las metodologías estandarizadas, impidiendo consecuentemente su correcta comparación.

Los intentos realizados para comparar la sensibilidad de distintas especies de anuros, o de establecer escalas de sensibilidad con la información existente en la literatura, se encontraron con la dificultad de que, además de la disparidad de especies químicas utilizadas y de la existencia de una gran variabilidad metodológica en los diseños experimentales empleados (Birge et al, 2000), no contemplaron factores relevantes para el presente trabajo de tesis: origen de las puestas, en relación con la variabilidad geográfica, temporal y estacional, aportada por los diferentes ambientes en los que habitarían las poblaciones. Estas dificultades, en principio impiden asociar significancias a las comparaciones y ordenamientos logrados, permitiendo solamente realizar descripciones de las sensibilidades relativas de las diferentes especies estudiadas a un tóxico, y finalmente impiden lograr interpretaciones biológicas válidas respecto a la sensibilidad de los anuros.

En el presente trabajo de tesis se establecieron condiciones de ensayo y se seleccionó entre las técnicas estadísticas más utilizadas en esta disciplina, un procedimiento -conjunto de técnicas combinadas- que permitió la resolución de

bioensayos y la comparación de resultados obtenidos en las diferentes experiencias, mediante pruebas de significancia. Esto permitió realizar comparaciones entre las distintas especies estudiadas, entre otros agrupamientos realizados y establecer niveles de sensibilidad para las especies de la taxocomunidad estudiada empleando como referencia la respuesta al Cr(VI). Finalmente se realizaron comparaciones entre los resultados obtenidos y la sensibilidad al cromo publicada para otras especies y grupos taxonómicos.

Si consideramos la totalidad de ensayos realizados, dentro del intervalo de toxicidad estudiado, la concentración más baja que no causó efectos (NOEC) sobre ninguna de las especies fue de 0,05mg Cr(VI)/L, siendo la mínima concentración que causó algún tipo de efecto (LOEC) 0,1mg Cr(VI)/L. A partir de esta concentración y hasta 120 mg/L, la máxima evaluada, se detecta un aumento en la magnitud de la respuesta hasta alcanzar el 100% de mortalidad. En este caso el punto final para calcular el LOEC fue la mortalidad, debido a que los efectos subletales observados en *H. pulchellus* se dan a concentraciones comparativamente altas (3,6,9 y 12 mgCr(VI)/L) para los distintos tiempos considerados y las LC-50_{96h} para las especies más sensibles estudiadas, se encontraron a concentraciones significativamente menores, por ejemplo *S. squalirostris* 1,4 (0,976-2,062) y *L. ocellatus* 2,0 (0,07-4,156) mgCr(VI)/L.

En el Capítulo II se formularon preguntas respecto a: si “las especies más emparentadas presentan entre si sensibilidades más similares que las especies filogenéticamente más alejadas”; o si “la sensibilidad de las diferentes especies de anuros está relacionada con la distancia filogenética entre especies y en qué magnitud”. Los resultados obtenidos en el presente trabajo en relación con esas preguntas, si bien no indican diferencias a nivel de género y familia, lo que en principio nos llevó a rechazar la hipótesis filogenética propuesta (**H91**) en su conjunto, consideramos que no son suficientes para el rechazo categórico de esta hipótesis. Ello se debe a que, si bien los resultados obtenidos a partir de la sensibilidad de las larvas de las diferentes especies no concuerda en principio con las jerarquías taxonómicas reconocidas, estas categorías son hipótesis filogenéticas que pueden estar lejos de reflejar fehacientemente las relaciones reales o distancias filogenéticas existentes entre las especies estudiadas.

En lo referente a la variabilidad interespecífica, al considerar la sensibilidad obtenida para las diferentes especies de anuros, teniendo en cuenta la amplia variabilidad de respuesta encontrada en *H. pulchellus*, también observada en *P. fernandezae* (poblaciones de punta Lara y Punta Indio), e incorporando a este análisis los conocimientos acerca de la variabilidad de respuesta de los diferentes organismos de prueba mencionados en el transcurso de la tesis, podríamos especular con que este comportamiento se reiteraría para las distintas especies estudiadas. Es decir, si fuera cierto que todas las especies estudiadas muestran una variabilidad de respuesta amplia (de magnitud semejante a la de *H. pulchellus*), al realizar comparaciones entenderíamos que la sensibilidad de las diferentes especies de anuros no sería tan distinta. Dicho de otro modo, la magnitud de su variabilidad impediría distinguir entre una especie más sensible

que otra, a través de los métodos de la toxicología acuática, lo que tendría implicancias a considerar en la interpretación ecotoxicológica de este grupo.

Aquí queda reflejada la necesidad de seguir estudiando la magnitud de la variabilidad de respuesta para las distintas especies de anuros en su fase de vida acuática, contemplando las fuentes de variación propuestas y empleando diseños experimentales potentes, que permitan efectuar comparaciones con los métodos existentes.

La relación entre el tipo ecológico de la larva y la sensibilidad al Cr(VI) en bioensayos de toxicidad aguda con larvas en STD 25 no fue detectada por los medios utilizados. De todas maneras, la pregunta formulada en este sentido en el Capítulo II está orientada a detectar si esta clasificación ecológica determinaría o estaría relacionada de alguna manera con las diferencias observadas en la sensibilidad entre las especies en bioensayos de laboratorio, según la metodología propuesta, ya que las diferencias ecológicas en cuanto al comportamiento no fueron analizadas en este tipo de ensayos. Es decir, las larvas ensayadas tuvieron una exposición total (recipiente, agua, renacuajo y tóxico), sin posibilidad de escapar u ocultarse. Este escenario ha sido ampliamente criticado desde el punto de vista ecotoxicológico debido a su bajo grado de relevancia ecológica (Burkhart *et al.*, 2003). En los sistemas naturales ello sería totalmente diferente, ya que no sólo los renacuajos podrían escapar u ocultarse, modificando así la posible exposición al tóxico, sino que el sistema brindaría compartimentos con propiedades fisicoquímicas influyentes sobre la distribución del tóxico. Este rol ecológico o comportamiento de los organismos, podría ser beneficioso o perjudicial, según el contaminante y el escenario de exposición.

No se descarta que exista en el ambiente una relación debido al hábito, es decir los renacuajos bentónicos estarían más expuestos que los nectónicos, en sitios contaminados con xenobióticos que se acumulen en el sedimento. Por el contrario los renacuajos nectónicos podrían estar más expuestos a un pulso de contaminación agudo que los renacuajos que habitan en el fondo rodeados de sedimento.

Los fundamentos para responder la pregunta formulada en el Capítulo II, sobre si “la sensibilidad de las especies y posibilidad de exposición que conlleva su posible muerte o extinción está asociada con su estrategia reproductiva y/o su modo de vida”, se encuentran fuera del alcance de esta investigación.

De todos modos, a partir de la experiencia adquirida en campo y laboratorio, consideramos adecuado proponer a las distintas estrategias de vida como posibles factores que influyen sobre la exposición de los huevos, embriones y larvas. Si consideramos la evolución como un proceso de cambios graduales en el que actúan factores de selección sobre las distintas poblaciones de organismos, vemos que es evidente que la estrategia reproductiva y el modo de vida van a condicionar o no la supervivencia de una especie. Nos referimos en este caso en particular al modo en que los huevos, embriones y larvas, ante un eventual evento de contaminación, podrían estar expuestos, y cómo estas estrategias, que van

desde el tipo de cobertura de los huevos y su composición, hasta el tipo de ambiente en que se reproducen, el tiempo de posible exposición (duración del ciclo como larva) y el modo de vida o tipo ecológico de larva (bentónico, nectónico), intervienen en el evento de contaminación, aumentando o disminuyendo la exposición a un tóxico o contaminante determinado.

Con referencia a si la selección que el hombre efectúa por medio de la contaminación actúa sobre todos los renacuajos de un ecosistema de la misma manera, consideramos que de acuerdo a los resultados obtenidos, esto no es así. Por un lado, los renacuajos de las diferentes especies de la comunidad no poseen la misma sensibilidad, y por otra parte es posible, como mencionamos anteriormente, que exista una relación que se da en el medio natural, entre el hábito y las posibilidades de exposición ante un escenario de contaminación determinado. Fundamentalmente habría que considerar la discusión planteada en el Capítulo IV sobre las hipótesis **IED** versus hipótesis **estocástica**. Si ésta fuera cierta, la contaminación no estaría actuando como un factor de selección, ya que actuaría de manera justamente estocástica sin una forma definida, no seleccionando a partir de la respuesta una expresión genéticamente determinada, sino todo lo contrario, la selección sería producto del azar y no actuaría seleccionando ningún genotipo particular.

7 CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos y teniendo en cuenta las limitaciones mencionadas, se considera que habiendo analizado todas las especies de una comunidad, estaríamos en condiciones de afirmar que las larvas de las especies de anuros estudiadas son organismos adecuados para realizar experimentos de laboratorio (ensayos bioecológicos) y estudios de toxicidad (bioensayos).

La contaminación por Cromo afecta la fase de vida acuática de los anuros estudiados, ejerciendo efectos nocivos: alteraciones en el comportamiento (natación), inhibición del crecimiento, distinto tipo y grado de malformaciones y muerte sobre distintos estadios del desarrollo de todas las especies estudiadas.

Se han logrado aportes significativos que describen en detalle los efectos agudos del cromo a lo largo del ciclo de vida acuática identificando la etapa (CLS) en que las larvas de *H. pulchellus* son más afectadas.

Los resultados de las exposiciones crónicas evidencian que los renacuajos de *H. pulchellus* responden, modificando la tasa de crecimiento y manteniendo fija la tasa de desarrollo. Un hallazgo significativo involucrado en esta respuesta fue la exaltación del crecimiento detectada frente a las concentraciones subletales altas de cromo. Estos resultados insinúan la necesidad de abordar futuros estudios con el objetivo de dilucidar los mecanismos fisiológicos que poseen las larvas de

anuros relacionados con fase toxicocinética y toxicodinámica en la exposición al cromo en soluciones acuosas.

Teniendo en cuenta el interés de contar con organismos de referencia local para el diagnóstico ambiental de los impactos de la contaminación, se han generado las líneas de base necesarias para poder considerar a *H. pulchellus* como una especie de referencia en el desarrollo de herramientas bioanalíticas estandarizadas y su uso potencial en sistemas de diagnóstico aplicado al monitoreo regional de efectos biológicos dentro de programas de control ambiental.

Al considerar las larvas de las diferentes especies de la taxocomunidad estudiada, concluimos que existen diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad que presentan respecto al cromo (VI). Estas diferencias permitieron clasificar a las especies según niveles de sensibilidad, estableciéndose grupos sensibles, tolerantes y muy tolerantes, que permitieron abordar la problemática referida a su selección para ser utilizada como especie centinela o indicadora, en bioensayos de toxicidad aguda.

Las diferencias en los niveles de sensibilidad encontradas entre las diferentes especies no siguen un patrón identificable desde los puntos de vista sistemático y ecológico analizados. Para poder responder acabadamente la relación entre la sensibilidad y las categorías taxonómicas se deberán realizar futuras etapas de investigación que contemplen gran diversidad de especies, géneros multiespecíficos y familias multigenéricas, además de estudiar la sensibilidad relativa a diversas categorías de tóxicos.

La contaminación producida por cromo en ambientes naturales no actuará de la misma manera ante las diferentes especies de una comunidad, ya que las especies no sólo no responden de la misma manera ante este tóxico, sino que su posibilidad de exposición se encuentra relacionada con las particularidades de su biología (estrategia reproductiva, hábito de vida).

De las especies presentes en la comunidad estudiada, considerando su performance en el laboratorio y su sensibilidad al cromo, se propone a *S. squalirostris* como la más sensible, para ser escogida en futuras selecciones de especies centinelas o indicadoras de posibles deterioros en los ecosistemas acuáticos de la región, o riesgos potenciales sobre ecosistemas acuáticos naturales y modificados.

Teniendo en cuenta los niveles de sensibilidad mostrados por las especies de la taxocomunidad estudiada, junto a los valores umbrales de efecto letal y subletal, se esperaría que las concentraciones de cromo detectadas en cuerpos de agua contaminados de la región signifiquen un riesgo para algunas de ellas.

Las especies de la comunidad estudiada poseen una sensibilidad media respecto a la encontrada para otros organismos acuáticos del mundo, resultando en la clasificación general, como tolerantes a la contaminación por cromo.

Si consideramos las tendencias existentes en la literatura mundial, a pesar de que las especies de anfibios, particularmente los anuros, vienen siendo considerados como buenos indicadores de la calidad del ambiente, los argumentos empíricos que acompañan estas deducciones, incluidos los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, no son suficientes, y hasta el momento no reflejan *a priori* mayor o menor sensibilidad que otras especies de organismos acuáticos de agua dulce, estudiadas y publicadas en la literatura.

Las características ecológicas del complejo ciclo de vida larval de los anuros, generan un gran abanico de alternativas que brinda su plasticidad adaptativa, lo que se refleja en una gran variabilidad de respuestas, o dicho de otro modo una sensibilidad muy variable, con límites amplios que no la distinguen de las demás categorías taxonómicas animales que presentan hábitos acuáticos. Si además consideramos que poseen una gran diversidad morfológica y están presentes en la mayor parte de los ecosistemas, abarcando también una gran cantidad de hábitats, que conllevan diferentes escenarios de exposición, vemos que las mismas razones por las que los anfibios anuros han sido propuestos en muchos casos como organismos centinelas o indicadores de impacto ambiental y riesgo ecológico, nos llevan a pensar que particularmente los anuros como grupo, poseen una amplia gama de respuestas y atenuantes para evadir el estrés provocado por el ingreso de sustancias químicas en los ecosistemas donde habitan.

Finalmente, consideramos que este trabajo brinda información básica sobre ecotoxicología de anuros autóctonos, y presenta de manera clara el panorama actual de esta ciencia en la Argentina, mostrando los huecos existentes en la investigación y dejando ver los caminos a seguir, aporta elementos para responder las preguntas formuladas, presentando nuevas preguntas de investigación y enunciando nuevas hipótesis producto de la investigación. Asimismo brinda elementos para abordar la discusión acerca del posible empleo de anuros como indicadores o centinelas de la contaminación, además de contar con mayor información sobre su posible sensibilidad y susceptibilidad a los distintos agentes contaminantes o de estrés químico.

BIBLIOGRAFIA

Abbasi S.A., Soni R. (1984). Teratogenic effects of chromium (VI) in environment as evidenced by the impact on larvae of amphibian *Rana tigrina*: implications in the environmental management of chromium. *Int J Environ Stud* 23:131-137.

Adelman I.R., Smith L.L. (1976). Fathead minnows (*Pimephales promelas*) and goldfish (*Carassius auratus*) as standard fish in bioassays and their reaction to potential reference toxicants. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 33:209-214.

Alford R.A. (1999). Ecology. Resource Use, Competition, and Predation. En: Mc Diarmid R.W. and Altig R., editors. *The biology of anuran larvae*. The university of Chicago Press. Chicago. p 240-278.

Ammassari L. L., Grandi, F., Natale, G.S. (2002). Efecto de la densidad y la superficie sobre el crecimiento de larvas de *Odontophrynus americanus* en condiciones controladas de laboratorio. XVI Reunión de Comunicaciones Herpetológicas. 10 Al 12 de noviembre de 2002. La Plata, Buenos Aires.

Anderson P.D., Spear P.A. (1980). Copper pharmacokinetics in fish gills. II. Body size relationships for accumulation and tolerance. *Water Res.* 14:1107-1111.

Anguiano O.L., Montagna C.M., Chifflet de Llamas M., Gauna, L., Pechén de D'Angelo A.M. (1994). Comparative toxicity of parathion in early embryos and larvae of the toad, *Bufo arenarum* Hensel. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 649-655.

Apartin C.D., Ronco A.E. (2001). Evaluation of a b-Galactosidase *in vitro* enzymatic test specific for heavy metal toxicity. *Environmental Toxicology*, 16(2) 117-120.

APHA (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Baltimore: American Public Health Association- American Water Works Association- Water Pollution Control Federation.

Association française de normalisation (AFNOR) (1986). *Eaux: méthodes d'essai*. Edité par l'AFNOR, Paris.

ASTM (1991). *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Test with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians*. American Society for Testing and Materials, ASTM. E 729-88A.

ASTM (1994). *Annual Book of ASTM Standards Volumen 11.01. Water* American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

Bantle J.A., Dumont J.N., Finch R.A., Linder G. (1990). Atlas of Abnormalities: A Guide for the performance of FETAX. Stilwater: Oklahoma State Publications Departament. 72pp.

Bantle J.A. (1995). Fetax - A Developmental toxicity assay using frog embryos. In: Fundamentals of aquatic toxicology. Second ed. Rand G.M., editor. Taylor & Francis; North Palm Beach, Florida. pp 207-230.

Baran E. J. (1995). Química Bio-inorgánica. McGraw Hill. Madrid. Capítulo 1, 8p.

Barinaga M.(1990). Where have all the froggies gone? Science 247:1033-1034.

Barnhart J. (1997). Occurrences, uses, and properties of chromium. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 26: S3-S7

Barrio A. (1953). Sistemática, morfología y reproducción de *Physalaemus henselii* (Peters) y *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel). Physis, Buenos Aires, 20 (59): 379-389.

Barrio A. (1961). Revalidación de *Physalaemus barbouri* (Parker). Bol. ALAIH 3.

Barrio A. (1962). Los *Hylidae* de Punta Lara, provincia de Buenos Aires. Observaciones sistemáticas, ecológicas y análisis espectrográfico del canto. Physis, Buenos Aires, 23 (65): 129-142.

Barrio A. (1963). Consideraciones sobre comportamiento y "grito agresivo" propio de algunas especies de *Ceratophrynidae* (*Anura*). Physis, Buenos Aires, 24 (67): 143-148.

Barrio A. (1963). Influencia de la temperatura sobre el canto nupcial de *Hyla squalirostris* (A. Lutz) (*Anura*, *Hylidae*). Physis, Buenos Aires, 24 (67): 137-142.

Barrio A. (1964a). Caracteres eto-ecológicos diferenciales entre *Odontophrynus americanus* (Duméril et Bibron) y *O. occidentalis* (Berg) (*Anura*, *Leptodactylidae*). Physis, Buenos Aires, 24 (68): 385-390.

Barrio A. (1964b). Peculiaridades del canto nupcial de *Melanophryniscus stelzneri* (Weyenbergh) (*Anura*, *Brachycephalidae*). Physis, Buenos Aires, 24 (68): 435-437.

Barrio A. (1964c). Relaciones morfológicas, eto-ecológicas y zoogeográficas entre *Physalaemus henseli* (Peters) y *P. fernandezae* (Müller) (*Anura*, *Leptodactylidae*). Acta zool. lilloana, 20: 285-305.

Barrio A. (1964d). Characteristics of *Hyla berthae* (*Amphibia*, *Salientia*). COPEI, (3): 583-585.

- Barrio A. (1965). Afinidades del canto nupcial de las especies cavícolas del género *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae). Physis, Buenos Aires, 25 (70): 401-410.
- Barrio A. (1965). El género *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) en la Argentina. Physis, Buenos Aires, 25 (70): 421-448.
- Barrio A. (1965). Las subespecies de *Hyla pulchella* (Duméril y Bibron) (Anura, Hylidae). Physis, Buenos Aires, 25 (69): 115-128.
- Barrio A. (1966). Descripción del alotipo macho y del canto nupcial de *Trachycephalus siemersi* (Mertens) (Anura: Hylidae). Physis, Buenos Aires, 26 (71): 225-228.
- Barrio A. (1967). Notas complementarias sobre el género *Physalaemus* (Fitzinger) (Anura, Leptodactylidae). Physis, Buenos Aires, 27 (74): 5-8.
- Barrio A. (1967). Sobre la validez de *Hyla sanborni* (K.P. Schmidt e *H. uruguayana* (K.P. Schmidt) (Anura, Hylidae). Physis, Buenos Aires, 26 (73): 521-524.
- Barrio A. (1969). Observaciones sobre *Chthonerpeton indistinctum* (Gymnophiona, Caeciliidae) y su reproducción. Physis, Buenos Aires, 28 (77): 499-503.
- Barrio A. (1970). Caracteres del canto nupcial de los pseudidos (Amphibia: Anura). Physis, Buenos Aires, 29 (79): 511-515.
- Barrio A., Pistol de Rubel D. (1970). Características del cariotipo de los pseudidos (Amphibia, Anura). Physis, Buenos Aires, 29 (79): 505-510.
- Barrio A., Rinaldi de Chieri P. (1970). Relaciones cariosistémicas de los *Ceratophryidae* de la Argentina (Amphibia, Anura). Physis, Buenos Aires, 30 (80): 321-329.
- Barrio A., Pistol de Rubel D. (1972). Encuesta cariotípica de poblaciones argentino-uruguayas de *Odontophrynus americanus* (Anura, Leptodactylidae) relacionada con otros rasgos taxonómicos. Physis, Buenos Aires, 31 (82): 281-291.
- Basso N.G. (1990). Estrategias adaptativas en una comunidad subtropical de anuros. Cuadernos de Herpetología. Serie Monogr. N°1, 70 pp.
- Basso N.G., Kehr A.I. (1992). Estructura poblacional y crecimiento de *Hyla pulchella pulchella* (Anura: Hylidae). Acta Zoológica Lilloana 41: 143-148.
- Beck C.W. (1997). Effect of changes in resource level on age and size at metamorphosis in *Hyla squirella*. Oecología 112:187-192.

- Beebee T.J.C. (1995). Amphibians and climate change. *Froglog* (12).
- Berkson J. (1951). Why I prefer logits to probits. *Biometrics*, 7:327-329.
- Berrill M., Bertram S., Wilson A., Louis S., Brigham D., Stromberg C. (1993). Lethal and sublethal impacts of pyrethroid insecticides on amphibian embryos and tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 12(3):525-39.
- Berrill M.S., Bertram S., McGillivray L., Kolohan M., Pauli B. (1994). Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* 13:657-664.
- Bidwell J.R., Gorrie J.R. (1995). Acute toxicity of a herbicide to selected frog species. Perth, Western Australia: West Australian Department of Environmental Protection. Technical Series N° 79.
- Bilos C., Colombo J.C., Rodríguez Presa M.J. (1998). Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Pollution*. 99: 1-11.
- Birge W.J. (1978). Aquatic toxicology of trace element of coal and fly ash. In: Thorp JH, Gibbons JW, editors. *Energy and environmental stress in aquatic systems (selected papers)*. Washington DC: Department of Energy. DOE Symposium Series. CONF-771114. p 219-240.
- Birge W.J., Westerman A.G., Spromberg J.A. (2000) Comparative toxicology and risk assessment of amphibians. In: Sparling DW, Linder G., Bishop C.A., editors. *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Pensacola: Society of Environmental Toxicology and Chemistry. p 727-791.
- Blaise C., Sergy G., Wells P., Bermingham N., van Coillie R. (1988). Biological testing – development, application and trends in Canadian environmental laboratories. *Toxic Assess.* 3: 385-406.
- Blaise C. (2000). Canadian application of microbiotest to assess the toxic potential of complex liquid and solid media. En: *New microbiotest for routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer academic. Plenum publishers, New York. Contribution 1: 3-11pp.
- Blaustein, A.R. (1994). Chicken little or Nero's finddle?. A perspective on declining amphibian populations. *Herpetologica* 1994; 50(1):85-97.
- Blaustein A.R., Wake D.B. (1995). Declive de las poblaciones de anfibios. *Investigación y Ciencia*. 8-13.
- Blaustein, A.R. (2001). Vanishing Amphibians. *Defenders Magazine*.

Bliss C.L. (1935). The calculation of the dosage-mortality curve. *Ann. Appl. Biol.* 22:134-307.

Bokermann W.C.A. (1963). Girinos de anfíbios brasileiros –2 (Amphibia, Salientia). *Rev. Brasil. Biol.* 23:349-353.

Bordeau P., Haines J.H., Klein W., Murti C.R.K. (1989). Eds. *Ecotoxicology and climate Scope* 38.

Bordeau P., Butler G.C., Calamarl D., Gillen J.W., Lunda Y., Peakall D., Sheehan P., Persoone G., Truhaut R., Welts P. (1990). *Short-term Test for Non-genotoxic Effects: Methods for Assessing and Reducing Injury from Chemical Accidents en SCOPE 40*, John Wiley & Sons, New York.

Botkin, D.B. Keller, E.A: (2000). “Environmental Science”. *Earth as a living planet*. John Wiley & Sons, Inc., New York., 160-170 pp.

Bridges M.C., Rowe C.L., Hpkins W.A. (2003). Amphibian Conservation Genetics. En: *Amphibian Decline: an Integrated Analysis of Multiple Stressors effects*. Eds: Linder G, Krest K.K., Sparling D.W. Society of Environmental Toxicology and Chemistry SETAC. Pensacola. Cap. 2B: pp. 59-71.

Brown V.M. (1968). The calculation of the acute toxicity of mixtures of poisons to rainbow trout. *Water Res.* 2:723-733.

Buikema A.L. Jr., Benfield E.F. (1979). Use of macroinvertebrate life story information in toxicity test. *J. Fish. Res. Board Can.*, 36:321-328.

Buikema A.L., Niederlehener B.R., Cairns J. (1982). Biological monitoring. Part IV: toxicity testing. *Water research*, 16:239-262.

Bulus Rossini G., Ronco A.E. (2004). Sensitivity of *Cichlasoma facetum* (*Cichlidae*, *Pisces*) to Metals, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72:763-768..

Burkhart J.G., Bidwell J.R., Fort D.J., Sheffield S.R. (2003). Chemical Stressors In: Linder G, Krest SK, Sparling DW, editors. *Amphibian Decline: an Integrated Analysis of Multiple Stressors effects*. Pensacola: Society of Environmental Toxicology and Chemistry. p. 111-128..

Cabrera A.L. (1949). Las comunidades vegetales de los alrededores de La Plata (Provincia de Buenos Aires, República Argentina). *Lilloa* XX, 269-347 pp.

Cabrera A.L., Willink A. (1973). *Biogeografía de América Latina*. Monografía 13, Serie de Biología, OEA, Washington D.C.

Cabrera A.L. (1976). Regiones Fitogeográficas Argentinas. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, Tomo II, Fascículo 1, Ed. Acme, Buenos Aires, 85 pp.

Cairns J. Jr. (1986). Management of water quality and natural habitats to enhance both human and wildlife needs. En Cairns, J. Jr. y R. Patrick (Eds.). Environmental regeneration II: Managing water resources. Praegen Publ., Filadelfia pp. 86-99.

Cajade R.; Natale G.S. (2002). Influencia del tipo de alimentación en el crecimiento larvario de *Odontophrynus americanus* (Leptodactylidae: Anura). XVI Reunión de Comunicaciones Herpetológicas. 10 Al 12 de Noviembre de 2002. La Plata, Buenos Aires.

Camilión M.C., Manassero, M.J., Hurtado M.A., Ronco A.E. (2003). Copper, Lead and Zinc distribution in soils and sediments of the South Western coast of the Río de la Plata estuary, Journal of Soils and Sediments, 3(3) 213-220, 2003.

Canevari P., Blanco D.E., Bucher E. H., Castro G., DAVIDSON I. (eds) (1998). Los Humedales de la Argentina: Clasificación, Situación Actual, Conservación y Legislación. Wetlands Internat. Publ., 46. Buenos Aires, Argentina.

Carriquiriborde P., Ronco A.E. (2002). Acute Effect of Metals on the Neotropical Species *Odonthestes bonariensis* (Pisces, Atherinidae). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 69:294-301.

Carriquiriborde (2004). Tesis: Respuestas Biológicas a Contaminantes Ambientales en Peces: Estudios de la bioconcentración, de los efectos letales y subletales y la evaluación de biomarcadores en *Odonthestes bonariensis*. Expuesto a Diferentes concentraciones de Cadmio y Cromo en el agua.

Castañe P.M., Salibián A., Zylbersztejn C., Herkovits J. (1987). Ontogenic screening of aldosterone in the South American toad *Bufo arenarum* (Hensel). Comp. Biochem. Physiol. 86 (4): 697-701.

Castillo Morales G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de la calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Gabriela Castillo. México, 2004.

CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment) (2001). Canadian sediment quality guidelines for protection of aquatic life: Summary tables. Updated. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian council of Ministers of the Environment Winnipeg. Excerpt from Publication No. 1299; ISBN 1-896997-34-1.

Cei J.M. (1980). Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano, Italian Journal of Zoology, Monografia 2*: 1-609; 1-16 láms., 1-24 color láms., 1-214 figs. Copyright ©2000.

Cei, J.M. (1987). Additional notes to "Amphibians of Argentina": An update, 1980-1986. *Monit.Zool.italiano (N.S.)* 21:209-272.

Cotton F.A., Wilkinson G. (1966). *Advanced inorganic chemistry*, New York, Interscience, 1136 pp.

Cowles R.B., Bogert C.M. (1944). A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bull. American J. Physiol.* 237:1274-1279.

Crump M.L. (1974). Reproductive strategies in a tropical anuran community. *Misc. Publ. Mus. Nat. Hist., Univ. Kansas* (61):1-68.

Degrémont (1978). *Mémento Technique de l'eau. Technique et Documentation*, Paris.

De la Torre, F. (2001). Tesis: Estudio de la contaminación acuática mediante bioensayos y parámetros fisiológicos y bioquímicos, indicador de estrés ambiental. *Disertación Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*.

Demichelis S.O., de la Torre F., Ferrari L., García M.E., Salibián A. (2001). Tadpoles assay: Its application to a water toxicity assessment of a polluted urban river. *Environmental Monitoring and Assessment.* (68):63-73.

Dixon D.G., Sprague J.B. (1981). Acclimation to copper by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) a modifying factor in toxicity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38:880-888.

Duellman W.E. (1970). The hylid frogs of Middle America. *Mus. Nat. Hist., Univ. Kansas Monogr.* (1):1-753, 72 plates.

Duellman W.E. (1978). The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Misc. Publ. Mus. Nat. Hist., Univ. Kansas* (65): 1-352, 4 plates.

Duellman W.E., Trueb L. (1994). *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press. Maryland , London, 670 pp.

Duellman W.E. (1995). Temporal fluctuations in abundances of anuran amphibians in a seasonal Amazonian rain forest. *Journal of Herpetology* 19: 13-21.

Dugan P. (1992). *Conservación de humedales. Un análisis de temas de actualidad y acción inmediata*. UICN. Gland, Suiza.

Ecosim. Homepages.together.net/~gentsmin/ecosim.htm.

Eisler R. (1986). Chromium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report 85 (1.6). 60pp.

Emerson S.B. (1986). Heterochrony and frogs: The relationship of a life history trait to morphological form. *American Nat.* 127: 167-183.

Enciclopedia Encarta (1993-2003). Microsoft Corporation

Environment Canada (1999). Guidance document on application and interpretation of single-species tests in environmental toxicology. Ottawa: Environmental Technology Centre, EPS 1/RM/34. 203 p.

Estudios de Aguas Subterráneas del NorEste (E.A.S.N.E) (1970). Algunos Caracteres Geohidrológicos de las cuencas que se extienden desde el Arroyo El Pescado hasta el Arroyo San Felipe. Consejo Federal de Inversiones, Gonnet.

Etcheverría D.D., Fiorito de Lopez L.E., Montanelli S.B., Vaccaro O.B., Filipello A.M. (1987). Consideraciones acerca de las fórmulas dentarias de las larvas de *Bufo arenarum* Hensel (Anura: Bufonidae). *Cuad. Herpetol.* 3:33-39.

Faivovich J., Haddad C.F.B., Garcia P.C.A., Frost D.R., Campbell J.A., Wheeler W.C. (2005). Systematic review of the frog family *Hylidae*, with special reference to *Hylinae*: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* Number 294 (2005), pp. 1–240.

Feder M.E. (1992). A perspective on environmental physiology of the amphibians. En :Environmental physiology of the amphibians. Feder M.E. y Burggren W.W. Eds., University of Chicago Press. Chicago. Cap 1 pp:1-6.

Fernández K., Fernández M. (1921). Sobre la biología y reproducción de batracios argentinos. I. Cystignathidae. *Ann. Soc. Cient. Argentina* 91:97-140.

Fernández K. (1927). Sobre la biología y reproducción de batracios argentinos. *Bol. Acad. Nac. Cienc. Córdoba* 29 (2): 271-328.

Ferrari L., Salibián A., Muiño C.V. (1993). Selective Protection of Temperature against Cadmium Acute Toxicity to *Bufo arenarum* Tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* (50):212-8.

Ferrari L., Demichelis S.O., García M.E., de la Torre F., Salibián A. (1997). Premetamorphic Anuran Tadpoles as Test Organism for an Acute Aquatic Toxicity Assay. *Environmental toxicology.* 117-21.

Ferrari L., de la Torre F., Demichelis S.O., García M.E., Salibián A. (2005). Ecotoxicological assessment for receiving waters with the premetamorphic tadpoles acute assay. *Chemosphere*. 59:567-75.

Finney D.J. (1971). Probit analysis. London: Syndies of the Cambridge University Press. 333 p.

Finney D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay, 3rd Ed. Griffin. London.

Fogels A, Sprague J.B. (1977). Comparative short-term tolerance of zebrafish, flagfish, and rainbow trout to five poisons including potential reference toxicants. *Water. Res.* 11:811-817.

Formas J.R., Pugín (1971). Reproducción y desarrollo de : *Batrachyla antartandica* (Barrio) (Anura, Leptodactylidae). *Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Chile* 32:201-213.

Fry F.E.J. (1947). Effects of the environment on animal activity. Univ. Toronto Stud. Biol. Ser. 55. Publ. Ont. Fish. Res. Lab. 68.

Fry F.E.J. (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. En: *Fish Physiology*, vol.6, Environmental Relations and Behavior. Eds: Hoar, W.S., Randall D.J. Academic. New York. pp 1-99.

Gallardo J.M. (1957). Las subespecies argentinas de *Bufo granulosus* (Spix). *Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. B. Rivadavia (Zool.)*, 3 (6): 337- 374.

Gallardo J.M. (1958a). Observaciones sobre el comportamiento de algunos anfibios argentinos. I. Referidas especialmente a la defensa, retorno y alimentación en *Bufo arenarum* (Hensel) y *Leptodactylus ocellatus* (L.). *Ciencia e Investigación*, 14 (7): 291-302.

Gallardo J.M. (1958b). Observaciones biológicas sobre *Leptodactylus prognathus* (Boulenger). *Ciencia e Investigación*. 14 (10-11): 460-465.

Gallardo J. (1958c). Estudio ecológico sobre los Anfibios y Reptiles de la depresión del Salado, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. B. Rivadavia (Ecol.)*, 2 (I): 1-26.

Gallardo J.M. (1961a). *Hyla strigilata* (Spix) e *Hyla squalirostris* (A. Lutz) en la República Argentina; y algunas observaciones sobre otros anfibios del grupo *Hyla rubra* (Daudin). *Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. B. Rivadavia*, 3 (5): 145-158.

Gallardo J.M. (1961b). Panorama zoológico argentino: Batracios y Reptiles. *Physis*, B. Aires, 22 (63): 171-180.

Gallardo J.M. (1961c). On the species of *Pseudidae* (*Amphibia*, *Anura*). *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 125 (4): 111-134.

- Gallardo J.M. (1961d). Observaciones biológicas sobre *Hyla raddiana* (Fitz)., de la Provincia de Buenos Aires. Ciencia e Investigación, 17 (3): 63-69.
- Gallardo J.M. (1961e). La ubicación sistemática y distribución geográfica de los *Brachycephalidae* argentinos. I Reunión Trabajo Comisión Ciencias Naturales Geogr. Litor. Argent., Santa Fe: 205-212.
- Gallardo J.M. (1961f). Nuevo género de *Brachycephalidae* (*Amphibia: Anura*). Neotrópica 7 (24): 71-72.
- Gallardo J.M. (1963). Observaciones biológicas sobre *Odontophrynus americanaunus* (D. et B.). Ciencia e Investigación, 19: 177-186.
- Gallardo J.M. (1964). *Leptodactylus gracilis* (D. et B.) y especies aliadas (*Amphibia, Anura*). Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. B. Rivadavia (Zool.), 9 (3): 37-57.
- Gallardo J.M. (1964). *Leptodactylus prognathus* (Bolu.) y *Leptodactylus mistacynus* (Burm.) con sus respectivas especies aliadas (*Amphibia, Leptodactylidae* del grupo "cavicola"). Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. B. Rivadavia (Zool.), 9 (5): 91-121.
- Gallardo J.M. (1964). Consideraciones sobre *Leptodactylus ocellatus* (L.) (*Amphibia, Anura*) y especies aliadas. Physis, B. Aires, 24 (68): 373-384.
- Gallardo J.M. (1964). Los anfibios de la Provincia de Entre Ríos, Argentina, y algunas notas sobre su distribución geográfica y ecología. Geotrópica, 10 (31): 23-28.
- Gallardo J.M. (1964). Una nueva forma de *Pseudidae* (*Amphibia, Anura*) y algunas consideraciones sobre las especies Argentinas de esta familia. Acta zool. Lilloana, 20: 193-209.
- Gallardo J.M. (1965). A proposito de os *Leptodactylidae* (*Amphibia, Anura*). Pap. Avul. Dpto. Zool. Sao Paulo, 17 (8): 77-87.
- Gallardo J.M. (1965). Consideraciones zoogeográficas y ecológicas sobre los anfibios de la Provincia de La Pampa, Argentina. Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. B. Rivadavia (Zool.), 1 (2): 57-77.
- Gallardo J.M. (1965). Especiación de tres *Bufo neotropicales* (*Amphibia, Anura*). Pap. Avul. Dpto. Zool. Sao Paulo, 17 (7): 57-75.
- Gallardo J.M. (1965). Las especies bonaerenses de pequeño tamaño del género *Physalaemus* (Fitzinger) (*Amphibia, Leptodactylidae*). Geotrópica, 11 (34): 27-37.

Gallardo J.M. (1966). Zoogeografía de los anfibios chaqueños. *Physis*, B. Aires, 26 (71): 67-81.

Gallardo J.M. (1968). Observaciones biológicas sobre *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel), (*Anura*, *Leptodactylidae*). *Ciencia e Investigación*, 24 (9): 411-419.

Gallardo J.M. (1968). Relaciones zoogeográficas de la fauna batracológica del oeste de la provincia de Santa Fe (Argentina). *Comunic. Mus. Arg. Cs. Nat. B. Rivadavia (Ecol.)*, 1 (1): 1-13.

Gallardo J.M. (1970). Estudio ecológico sobre Anfibios y Reptiles de Sudoeste de la provincia de Buenos Aires. *Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. B. Rivadavia (Zool.)*, 10 (3): 27-63.

Gallardo J.M. (1970). Interesante hallazgo en Sierra de la Ventana. *Camping*, 12: 67-69.

Gallardo J.M. (1972). Anfibios de la provincia de Buenos Aires. Observaciones sobre su ecología y zoogeografía. *Ciencia e Investigación*, 28 (1-2): 3-14.

Gallardo J.M. (1972). Los vertebrados cavícolas de la provincia de Buenos Aires. *IDIA suplemento*, 29: 55-62.

Gallardo J.M. (1972). Observaciones sobre Ecología y Zoogeografía de los Anfibios de la provincia de Buenos Aires. *Ciencia e Investigación*, 28 (1-2): 3-14.

Gallardo J.M. (1973). Conservación de la Fauna: Vertebrados, Reptiles y Anfibios. *Publ. Ext. Cul. Didáct. Mus. Arg. Cs. Nat. B. Rivadavia*, 20: 1-15.

Gallardo J.M. (1974). Anfibios de los alrededores de Buenos Aires. Editorial EUDEBA, Buenos Aires 7-231 pp., 1-16 láms, 1-3 figs.

Gallardo J.M. (1975). Taxonomía y comportamiento de los anfibios. Niveles taxonómicos del comportamiento. *Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. B. Rivadavia (Zool.)* 12 (1): 1-13.

Gallardo J.M. (1976). Estudio ecológico sobre los anfibios y reptiles de la depresión del Salado, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. B. Rivadavia (Ecol.)*, 2 (1): 1-26.

Gallardo J.M. (1979). Importancia de la conservación de las faunas de Anfibios y Reptiles. *Acta zool. lilloana*, 34:102-106.

Gallardo J. M. (1987). Anfibios Argentinos. Guía para su identificación. Biblioteca Mosaico, Buenos Aires. 98 pp.

Gallardo J. M. (1987). Anfibios y reptiles del Partido de Magdalena (Provincia de Buenos Aires). Artes Gráficas Rioplatenses S.A., Buenos Aires. 46 pp.

Gallardo J.M. (1980). Estudio ecológico sobre los anfibios y reptiles del noroeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina). Actas de la I Reunión Iberoamericana de Zoología. La Rábida, España. 1977, 331-349 pp.

Gallardo J.M. (1981). Aspectos ecológicos en Anfibios y Reptiles. SYMPOSIA, VI Jorn. Arg. Zool.: 152-157.

Gallardo J.M. (1982). Anfibios y Reptiles del Parque Nacional El Palmar de Colón, Provincia de Entre Ríos. Rev. Mus. Arg. Cienc. Nat. B. Rivadavia, Extra Nueva Serie, 128: 65-75 (de Anales Parques Nacionales 15: 65-75).

Gallardo J.M. (1987). Anfibios Argentinos. Guía para su identificación. Biblioteca Mosaico, Buenos Aires 98 pp.

Gallardo J.M. (1987). Anfibios Argentinos. Parte 1. *Amphibia y Reptilia* (Conservación), 1 (3): 60-66.

Gallardo J.M. (1988). Anfibios Argentinos. Parte 2. *Amphibia y Reptilia* (Conservación), 1 (5): 105-111.

Gallardo J. M., Varela de Olmedo E. (1992). Anfibios de la República Argentina: Ecología y Comportamiento. Fauna de Agua Dulce de la Argentina PROFADU (CONICET). Museo de La Plata, 41 (1): 1-116.

Gallardo J.M. (1993). Los anfibios de dos ecosistemas argentinos: algunas estrategias en la reproducción y el desarrollo. Bol. Soc. Zool.Uruguay, 2ª época, 8: 33-36.

Gayatri R., Rajamaram A., Rajamaram R., Govindaraju K., Rao J.R., Fair B.U., Ramasami T. (1997). Chormium induced structural changes in biomolecules. Proc Indian Acad Sci 109: 307-317.

Gosner K.L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica 16: 183-190.

Gotelli N.J., Entsminger G.L. (2001). EcoSim: Null models software for ecology. Version 7.0. Acquired Intelligence Inc. & Kesey-Bear

Gotelli N.J., Ellison A.M. (2004). A primer of ecological statistics. Sinauer Associates Inc. 23 Plumtree Road, sunderland, MA 01375 U.S.A.

Goyer R.A. (1996). Toxic Effects of Metals. In: Klaassen C.D., editor. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. New York: McGraw-Hill. p 691-735.

Grothe D., Kimerle R. (1985). Inter-and intra-laboratory variability in *Daphnia magna*. Effluent toxicity results. Environ. Toxicol. Chem., 4:189-192.

Gudynas E., Rudolf J.C. (1987). La herpetofauna de la localidad costera de "Pajas Blancas" (Uruguay): lista sistemática comentada y estructura ecológica de la comunidad. Comunicaciones do Museo de Ciências da PUCRS, Porto Alegre 46: 173-194.

Hayes T.B., Chan R., Licht P. (1993). Interactions of temperature and steroids on larval growth, development, and metamorphosis in a toad (*Bufo boreas*). J. Exp. Zool. 266:206-215.

Hayes T.B. (2000). Endocrine Disruption in Amphibians. In: Sparling DW, Linder G, Bishop CA, editors. Ecotoxicology of amphibians and reptiles. Pensacola: Society of Environmental Toxicology and Chemistry. p 573-593.

Heagler M.G., Newman M.C., Mulvey M., Dixon P.M. (1993). Alozyme genotype in mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, during mercury exposure: Temporal stability, concentration effects and field verification. Environ. Toxicol. Chem. 12:385-395.

Heber M.A., Reed-Judkins D.K., Davies T. (1996). Background and perspective, En Grothe D.R.; Dickson K.L, Reed-Judkins D.K. (Eds), Whole effluent toxicity testing: An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts, SETAC Press, Pensacola, Florida, 9-49.

Hensley F.R. (1993). Ontogenetic loss of phenotypic plasticity of age at metamorphosis in tadpoles. Ecology 74:2405-2412

Herkovits J., Perez-Coll C.S. (1999a) Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibio ("ANFITOX") Parte 1. Ingeniería Sanitaria y Ambiental 42: 24-30.

Herkovits J., Perez-Coll C.S. (1999b) Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibio ("ANFITOX"). Parte 2. Ingeniería Sanitaria y Ambiental 43: 50-55.

Herkovits J., Perez-Coll C.S., Herkovits F.D. (2002). Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). Environmental Pollution. (116):177-83.

Herrera R.A., Steciow M.M., Natale G.S. (2005). Chytrid fungus parasitizing the wild amphibian *Leptodactylus ocellatus* (Anura: *Leptodactylidae*) in Argentina. Diseases of Aquatic Organisms. 64 (3): 247-252.

Heyer R.W. (1969). The adaptive ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, *Leptodactylidae*). Evolution 23 (3): 421-428.

Heyer R.W. (1973). Ecological interactions of frog larvae at a seasonal tropical location in Thailand. J. Herpetol. 7:337-361.

Heyer R.W. (1975). A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frogs family *Leptodactylidae*. Smitshon. Contrib. Zool., 199: 1-55.

Heyer R.W. (1976). Studies in larval amphibian habitat partitioning. Smithsonian Contrib. Zool. (242):1-27.

Heyer W.R., Rand A.S., Da Cruz C.A.G., Peixoto O.L., Nelson C.E. (1990). Frogs of Boracéia. Arq. Zool. , Mus. Zool., Univ. São Paulo 31:231-410.

Heyer. R.W Donnelly M.A, McDiarmid R.W, Hayek L.C., Foster M.S. (1994). Measuring and Monitoring Biological Diversity. Smithsonian Institution 364pp.

Howe G.E. Gills R., Mowbray R.C. (1998). Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. Environ. Toxicol. Chem. 17:519-525.

Hutchinson T. (1796). The natural history of the frog fish of Surinam. 8p, 4 plates. York: G. Peacock

Inger R.F. Colwell R.K. (1977). Organization of contiguous communities of amphibians and reptiles in Thailand, Ecol. Monog., 47:229-253.

IPCS, WHO (1998). Environmental Health Criteria 61: Chromium. Geneva, World Health Organization.

Izecksohn E., Da Cruz C.A.G., Peixoto, O.L. (1979). Notas sobre o girino de *Proceratophrys boidei* (Wied) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Rev. Brasil.Biol. 39:233-236.

Janessen C., Persoone G., De Coen W. (2000). New microbiotest for routine toxicity screening and biomonitoring. Kluwer academic. Plenum publishers, New York. 550pp.

Jarvinen A.W., Ankley G.T. (1999). Linkage of Effects to Tissue Residues: Development of a Comprehensive Database for Aquatic Organisms Exposed to Inorganic and Organic Chemicals. 1 ed. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Pensacola Florida.

Jones K.L. (1982). Prey patterns and trophic niche overlap in four species of Caribbean frogs, U.S. Fish and Wildlife Res. Rept. 13:49-55.

Kehr A.I., Rodrigues A. (1984). Estudios biológicos en anfibios anuros del área platense. Capítulo I. Metabolismo energético de los estados larvales de *Bufo fernandezae* e *Hyla pulchella pulchella*.

- Kehr A.I. (1987). Crecimiento individual en larvas de *Hyla pulchella pulchella* y *Bufo fernandezae* en condiciones controladas de coexistencia y densidad (*Amphibia: Anura*). Cuadernos de Herpetología 3 (1): 1-6.
- Kehr A.I. (1989). Factores dependientes de la densidad y su influencia sobre el crecimiento individual de los estados larvales de *Hyla pulchella pulchella* (*Amphibia: Anura*). Limnobiós 2 (10): 757-761.
- Kehr A.I., Adema E.O. (1990). Crecimiento corporal y análisis estadístico de la frecuencia por clases de edades, de los estadios larvales de *Bufo arenarum* en condiciones naturales. Neotropica 36 (96): 67-81.
- Kehr A.I., Williams J.D. (1990). Larvas de Anuros de la República Argentina. Cuadernos de Herpetología (Serie Monografías) Nro 2, Asociación Herpetológica Argentina: 1-44.
- Kehr A.I. (1992). Disposición espacial de las masas de huevos y estados larvales en una población de *Hyla pulchella pulchella* (*Anura: Hylidae*). Acta Zoologica Lilloana 41: 135-142.
- Kehr A.I., Basso N.G. (1992). Consideraciones sobre la estructura de edades, supervivencia y tiempo de metamorfosis en los estados larvales de *Hyla pulchella pulchella* (*Anura: Hylidae*). Acta Zoologica Lilloana 41: 125-133.
- Kehr, A.I. (1994). Patrones de dispersión espacio-temporales y su influencia en la biología larval de *Bufo arenarum* (*Amphibia: Anura*). Neotropica 40 (103-104): 35-40.
- Kehr A.I. (1994). Density-dependent responses in tadpoles of *Bufo arenarum*. Physis (Bs. As.), Secc. B, 49 (116-117): 31-36.
- Klapow L.A., Lewis R.H. (1979). Analysis of toxicity data for California marine water quality standards. J. Water Pollut. Control Fed. 51:2054-2070.
- Kooijman S.A.L.M. (1987). A safety Factor for LC50 values allowing for differences in sensitivity among species. Water Research. 21(3):269-76.
- Kreimer E.D., Palacios D.E., Ronco A.E. (1996). A proposal for dredging contaminated sediments at the Dock Sud Port, Argentina. Proceedings of the International Conference on Coastal Environments, Buenos Aires. Pp. 435-444.
- Lajmanovich R.C., Lorenzatti E., de la Sierra P., Marino F., Peltzer P.M. (2002). First registrations of organochlorines pesticides residues amphibians of the Mesopotamic Region, Argentina. Froglog 54: 4.

Lajmanovich R.C., Sandoval M.T., Peltzer P.M. (2003). Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed by glyphosate formulations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70: 612–618.

Lanoo M.J. (1985). Neuromast topography in *Ambystoma* larvae. *Copeia* 1985:535-539.

Lavilla E.O. (1984). Larvas de *Telmatobius* (*Anura:Leptodactylidae*) de la Provincia de Tucumán (Argentina). *Acta Zool. Lilloana* 38:69-79.

Lavilla E.O., Rouges M. (1992). Reproducción y desarrollo de Anuros Argentinos. Cuadernos de Herpetología. Serie de divulgación N°5: 66 pp.

Lavilla E.O., Ponssa M.L., Baldo D., Basso N., Bosso A., Céspedes J., Chebez J.C., Faivovich J., Ferrari L., Lajmanovich R., otros. (2000). Categorización de los Anfibios de Argentina. En: Lavilla, E. O.; E. Richard y G. J. Scrocchi (Eds) Categorización de los Anfibios y Reptiles de la República Argentina. Edición Especial Asociación Herpetológica Argentina. 11-34.

Lavilla E.O. (2001). Amenazas, declinaciones poblacionales y extinciones en anfibios argentinos. *Cuadernos de Herpetología*.15(1):59-82.

Lavilla E.O., Cei J.M. (2001). Amphibians of Argentina. A second update, 1987-2000. Museo Regionale di Scienze Naturali Torino 28, Torino, Italia. 177 pp.

Lescure J. (1981). Contribution a l'étude des amphibiens de Guyane française. IX. Letérard dastromyzophore d'*Atelopus flavescens* Duméril et Bibron (*Anura, Bufonidae*). *Amphibia-Reptilia*. 2:209-215.

Linder G., Grillitsch B. (2000). Ecotoxicology of Metals. In: Sparling DW, Linder G, Bishop C.A., editors. Ecotoxicology of amphibians and reptiles. Pensacola: Society of Environmental Toxicology and Chemistry. p. 325-459.

Linder G.L., Branca S.T., Sparling D.W., Krest S.K. (2003). Introduction. In: Linder G, Krest SK, Sparling DW, editors. Amphibian Decline: an Integrated Analysis of Multiple Stressors effects. Pensacola: Society of Environmental Toxicology and Chemistry.

Lips K.R. (1998). Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology*;12(1):106-17.

Lips K.R., Reaser J, Young B.E. (1999). Disminución de la población anfibia en América Latina. Smithsonian Tropical Research Institute: 1-34.

Lips K.R. (1999). Mass mortality and population declines of anuran an upland site in Western Panama. *Conservation Biology*.13(1):117-25.

Lips K.R., Young B., Reaser J., Ibañez R., Salas A.. (2000). Declinación de los anfibios en América Latina: talleres para diseñar un Protocolo de Monitoreo y Base de Datos. *Froglog*; 37:2-4.

Lips K.R. Reaser J., Young B., Ibañez R. (2001). Monitoreo de anfibios en América Latina: Manual de Protocolos. SSAR, Herpetological Circular. No. 30:1-115.

Llamas V.C.; de Castro, A.C., Pechén de D'Angelo, A.M. (1985). Cholinesterase activities in developing amphibian embryos following exposure to the insecticides dieldrin and malathion. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 14: 161-166.

Mackeret F.J.H., Heron J., Talling J.F. (1978). Water analysis: some revised methods for limnologists. Titus Wilson & Son Ltd. - Freshwater Biological Association Scientific Publication, Kendall.

Mann R.M., Bidwell J.R. (2001). The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. *Environmental Pollution* 2001;(114):195-205.

Martori R., Di Tada I., Bedano J. (1983). Tácticas tróficas de la batracofauna de embalse de Río Tercero (Córdoba, Argentina). *Bol Asoc Herpetol Argentina* 1 (3):10.

Mc Diarmid R.W. y Altig R. (1999). Tadpoles: the biology of anuran larvae. Eds: Mc Diarmid R.W. y Altig R. The University of Chicago Press. London. 444 pp.

Mc Diarmid R.W. and Altig R. (1999) The Tadpole Arena. En: Mc Diarmid R.W. and Altig R., editors. The biology of anuran larvae. The university of Chicago Press. Chicago. p 1-6.

McKim J.M. (1977). Evaluation of test with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 34:1148-1154.

Meister R., Van Den Brink P.J. (2000). The analysis of laboratory toxicity experiments. En : *Statistics in Ecotoxicology*. Ed Sparks T. John Wiley & Sons, Chichester, England. Cap 4:pp.99-118.

Mercado L.M. (2000). Evaluación de la calidad de las aguas de seis sistemas lóticos pampásicos mediante el estudio de variables físicas y químicas. *Rev.Mus. Argentino Cienc. Nat., n.s.* 2 (1): 27-35.

Mertz W. (1969). Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol. Rev.*, 46: 163-239.

Morgan B.J.T. (1992). *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

Morton M.S., Elwood P.C. (1974). CNS. Malformations and trace elements in Water, 0, 4. 3418, 0, 1, 1369. *Teratology* 10 (3): 320.

NAS/NAE: National Academy of Sciences/National Academy of Engineering (1972). Water Quality Criteria. Rep to the Committee on Water Quality Criteria. EPA-R3-73-033. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency.

Natale G.S., Bulus Rossini G.D. (1996). Efecto de la alimentación en el crecimiento de *Bufo fernandezae*. I Jornadas Regionales Sobre Recursos Naturales y Medio Ambiente para Estudiantes Universitarios. Facultad de Ciencias Naturales y Museo UNLP. 23 al 25 de octubre de 1996. La Plata, Buenos Aires.

Natale G.S., Basso N.G., Ronco A.E. (2000). Effect of Cr(VI) on early life stages of three species of hylid frogs (*Amphibia*, *Anura*) from South America. *Environmental toxicology*, 15 (5): 509-512.

Nebeker A.V. (1982). Evaluation of a *Daphnia magna* renewal life-cycle test method with silver and endosulfan. *Water Res.*, 16:739-744.

Negrin M., Alcalde L., Fenoglio E., Natale G. (1999). Influencia del volumen y el número de individuos por frasco sobre el crecimiento de larvas de *Hyla pulchella* (Anura, hylidae) en condiciones controladas de laboratorio. Jornadas Regionales Sobre Los Recursos Naturales, El Hombre y El Ambiente. Facultad de Ciencias Naturales y Museo UNLP. 13 al 15 de Octubre 1999, Buenos Aires, Argentina.

Newman R.A. (1989). Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology* 70:1775-1787.

Newman R.A. (1992). Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: what type of phenotypic variation is adaptive, and what are costs of such plasticity?. *Bioscience* 42:671-678.

Newman R.A. (1998). Ecological constraints on amphibian metamorphosis: interactions of temperature and larval density with responses to changing food level. *Oecologia* 115:9-16.

Newman M.C., McCloskey J.T. (2000). The individual tolerance concept is not the sole explanation for the probit dose-effect model. *Environmental Toxicology and Chemistry*.19(2):520-526.

Newman M.C., Unger M.A. (2002). Sublethal effects to individuals. In: Newman MC, Unger MA, editors. *Fundamentals of Ecotoxicology*. New York: Lewis Publishers. p 149-172.

Newman M.C., Unger M.A. (2003). Acute and Chronic Lethal effects to individuals. En: Fundamentals of Ecotoxicology. Eds: Newman MC, Unger MA. New York: Lewis Publishers. pp:173-202.

Newman M.C., Unger M.A.. (2003). Fundamentals of Ecotoxicology. Eds: Newman M.C. y Unger M.A. Lewis Publishers, New York:. 458pp.

Pauli B.D., Perrault J.A., Money S.L. (2000). RATL: A Database of Reptile and Amphibian Toxicology Literature. Technical Report Series N° 357. Canadian Wildlife Service, Headquarters, Hull, Quebec, Canada.

Pechmann J.H.K., Scott D.E., Semlitsch R.D., Caldwell J. P., Vitt L.J., Gibbons J.W. (1991). Declining amphibian populations: The problem of separating human impacts from natural fluctuations. Science. 23; 253:892-5.

Pechmann J.H.K., Wilbur H.M. (1994). Putting declining amphibian populations in perspective: Natural fluctuations and human impacts. Herpetologica; 50(1):65-84.

Pechmann J.H.K., Wake D.B. (2004). Declines and disappearances of amphibian populations. Sinauer Associates. Second Edition.

Peixoto O.L. (1982). Observacoes sobre a larva de *Pleurodema diplolistris* (Peters 1870) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Rev. Brasil. Biol.. 42:631-633.

Peltzer P.M., Lajmanovich R.C., Beltzer A.H. (2003). The effects of habitat fragmentation on amphibian species richness in the floodplain of the middle Paraná River. Herpetol. J. 13: 95-98.

Peltzer P., Bock G., Tarvino R. y Lajmanovich R. (2004). Effects of habitat loss and fragmentation on anuran in Espinal Eco-region of Argentina: a GIS approach. Froglog, 63: 3-4.e., 2003, 2004

Perez-Coll C.S., Herkovits, J., Salibián, A. (1985). Effects of cadmium on the development of an amphibian. Arch. Biol. Med. Exper.. 18: 33-40.

Perez-Coll C.S., Herkovits J. (1999). Evaluación de la toxicidad del herbicida Glifosato sobre embriones de anfibio. 2da Reunión SETAC América Latina Bs.As.25-28 Octubre 1999. 32.

Perotti M.G., Dieguez M.C., Jara F.G. (2005). Estado del conocimiento de humedales del norte patagónico (Argentina): aspectos relevantes e importancia para la conservación de la biodiversidad regional Revista Chilena de Historia Natural.78: 723-737.

Pickering Q.H. (1988). Evaluation and comparison of two short-term fathead minnow test for estimating chronic toxicity. Water Res., 22:883-893.

Pisano A. (1939). Lo sviluppo del primi due quartetti isolati dell'uovo di Axolotl studiato mediante spianto. Arch. Zool. ital. 26:441-470.

Pough F.H., Kamel S. (1984). Post-metamorphic change in activity metabolism of anurans in relation to life history. Oecologia 65:138-144.

Quievryn G., Peterson E., Messer J., Zhitkovich A. (2002). Genotoxicity and mutagenicity of chromium (VI)/ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells. Biochemistry 42:1062-1070.

Qureshi A.D., Flood K.W., Thompson S.R., Junhurst S.M., Inniss C.S. y Rokosh D.A.. (1982). Comparison of a luminescent bacterial test with other bioassays for determining toxicity of pure compounds and complex effluents. En: Aquatic toxicology hazard assessment. 5th conf. ASTM STP 766. Eds: Pearson *et al.*, American Society Testing and Materials, ASTM, Philadelphia. p. 179-195.

Rand G.M. (1995). Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate, and risk assessment. Second ed. Ed: Rand G.M. Taylor & Francis; North Palm Beach, Florida. 1125 pp.

Rand G.M., Wells P.G., McCarty L.S. (1995). Introduction to aquatic toxicology. En: Fundamentals of aquatic toxicology. Second ed. Eds: Rand G.M. Taylor & Francis; North Palm Beach, Florida. Cap:1, 3-67pp.

Reynolds, W.W., Casterlin M.E. (1979). Behavioral thermoregulation and the "final preferendum" paradigm. American Zool. 19:211-224.

Ronco A.E., Bulus Rossini G.D. (1994). El uso de bioensayos como procedimiento para establecer decisiones más adecuadas en los criterios y el control de calidad de aguas. Primer Premio al mejor trabajo, 8 Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente, Asociación Argentina de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente AIDIS, 1993. En: Anales del XXIV Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Buenos Aires, Argentina, pp. 195-208.

Ronco A.E., Castillo G., Díaz M.C. (2000). Development and application of microbioassays for routine testing and biomonitoring in Argentina, Chile and Colombia. Chapter 1: Reviews on Toxicity Tests, Contribution 5. New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, G.Persoone, C.Janseen & W. De Coen, eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, 2000, p. 49-61.

Ronco A.E., Sobrero C., Gras V., Kaminski L., Massolo L., Mina L. (2000). Watertox bioassay intercalibration network: results from Argentina, Environmental Toxicology, 15:287-296.

Ronco A.E., Camilion C., Manassero M. (2001). Geochemistry of heavy metals in bottom sediments from streams of the western coast of the Rio de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Geochemistry and Health*, 23:89-103.

Ronco A.E., Díaz Báez C., Pica Granados Y. (2004). Conceptos generales. En: Castillo Morales, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de la calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Gabriela Castillo. México. pp: 17-22.

Ronco A.E., Díaz-Báez (2005). Capítulos 1, 2 ,3 y 7. En: *Metodologías Bioanalíticas de Control de Calidad de Agua. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. Edición conjunta IDRC, SEMA, IMTA:

Rue W.J., Fava J.A., Grothe D.R. (1988). A review of inter-and intralaboratory effluent toxicity test method variability. En: *Aquatic toxicology and hazard evaluation*. 10th vol. Eds. .Adams W.J., Chapman G.A., Landis W.G. American Society Testing and Materials, ASTM, Philadelphia. p. 190-203.

Salibián, A. (1970). Niveles séricos de Cl y de Na de la rana chilena *Calyptocephalella gayi* (Dum. Et Bibr., 1841): influencia del baño externo. *Arch. Biol.. Med. Exp. (Chile)* 7, 44-45.

Salibián A. (1992). Effects of Deltamethrin on the South American Toad, *Bufo arenarum*, Tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. (48):616-21.

Salibián A. (1993). Interpretación fisiológica de la declinación de las poblaciones de anfibios. Resúmenes 1º Jornadas de Medio Ambiente, La Plata 1993;p 123.

Salibián A.. (2006). Ecotoxicological Assessment of the Highly Polluted Reconquista River of Argentina. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*.185:35-65.

Sanabria E.A., Quiroga L.B., Acosta, J.C. (2005). Introducción de *Rana catesbeiana* (Rana toro) en ambientes pre-cordilleranos de la provincia de San Juan, Argentina. *Multequina*. 14: 65-68.

Schuytema G.S., Nebeker A.V. (1996). Amphibian toxicity data for water quality criteria chemicals. Report N° EPA/600/R-96/124. U.S.Environmental Protection Agency. Corvallis, Oregon.

Scott-Birabén, Fernández-Marcinowski (1921). Variaciones locales de caracteres específicos en larvas de anuros. *Ann. Soc. Cient. Argentina* 92:129-144.

Seale D.B. (1987). Amphibia. En: *Animal energetics*. Vol. 2, Panadian T.J. and Venberg E.J. editors. Academic Press. New York. Pp. 467-552.

Seyle H. (1973) The evolution of the stress concept. Am Sci.. 61: 692-699.

Semlitsch R.D., Scott D.E., Pechmann J.H.K. (1988). Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. Ecology 69:184-192.

Shi Y-B. (2000). Amphibian metamorphosis: From morphology to molecular biology. New York, NY, USA: Wiley-Liss. 288p.

Slooff W., Canton J.H. (1983). Comparison of the susceptibility of 11 freshwater species to 8 chemicals compounds. II. (Semi) chronic toxicity tests. Aquatic toxicology 4:271-282.

Smith D.C. (1987). Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. Ecology. 2(68):344-350.

Smith-Gill S. J., Berven K. A. (1979). Predicting amphibian metamorphosis. The American Naturalist . 113:563-85.

SMN (2003), Gacetilla N° 6 - El niño, situación actual y perspectivas.

SMN, www.meteofa.mil.ar

Sobrero M.C., Beltrano J., Ronco A.E. (2004). Comparative Response of *Lemnaceae* Clones to Cu(II), Cr(VI) and Cd(II) Toxicity. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology ISSN: 0007-4861, 73(2):416-423, 2004.

Sparks T. (2000). Statistics in Ecotoxicology. Eds: Sparks T. John Wiley & Sons, Chichester, England. 320 pp.

Sparling D.W., Linder G.L., Bishop C.A. (2000). Ecotoxicology of amphibians and reptiles. Eds: Sparling D.W., Linder G.L., Bishop Christine A. Pensacola, FL, USA.: Society of Environmental Toxicology and Chemistry; 875pp.

Sparling D.W., Bishop C.A., Linder G. (2000). The current status of amphibian and reptile ecotoxicological research. In: Sparling D.W., Linder G., Bishop C.A., editors. Ecotoxicology of amphibians and reptiles. SETAC. Pensacola: p 1-13.

Spear P.A., Pierce R.C. (1979). Koper in the aquatic environment: Chemistry, distribution and toxicology. Nat. Res. Counc. Can. Environ. Secretariat. NRCC N° 16454.

Spiro T.G., Stigliani W.M. (2004). Química medioambiental. Pearson Educación, S.A., Rivera del Loira, Madrid. 504pp.

Sprague J.B. (1971). Measurement of pollutant toxicity to fish, III: sublethal effects and "safe" concentrations. *Water Res.* 5: 245-266.

Sprague J.B. (1995). Factors that modify toxicity. En: *Fundamentals of aquatic toxicology*. Second ed. Rand G.M., editor. Taylor & Francis; North Palm Beach, Florida. p 1012-1051.

Stearns D.M. (2000). Is chromium a trace essential metal? *BioFactors* 11:149-162.

Stebbins R.C y Cohen N.W. (1995). *A natural History of Amphibians*. Princeton University Press, 316pp.

Strickland J.D.H., Parsons T.R. (1972). *A practical handbook of sea-water analysis*. 2nd Edition. J. Fish. Res. Bd. Canada. 167: 311 pp.

Thornthwaite C.W., Mather J.R. (1955). *The water balance*. Centerton, NJ: Drexel Institute of Technology - Laboratory of Climatology. 104p. (Publications in Climatology, vol. VIII, n.1).

Sugiyama M., Wang X., Costa M. (1986). Comparison of DNA lesions and cytotoxicity induced by calcium cromate in human, mouse, and hamster cell lines. *Cancer Res* 46:4547-4551.

Suter G.W. (1993). *Ecological Risk Assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton.

Toft C.A., Duellman W.E. (1979). Anurans of the lower Río Llullapichis, Amazonian Peru: a preliminary analysis of community structure, *Herpetologica*, 35:71-77.

Toft C.A. (1982). Community structure of litter anurans in a tropical forest, Makokov, Gabon: a preliminary analysis in the minor dry season, *Terre et Vie*. 36:223-232.

Travis J. (1984). Anuran size at metamorphosis: Experimental test of a model based on intraespecífico competition. *Ecology*. 65: 1155-1160.

Travis J., Emerson S.B., Blouin M. (1987). A quantitative genetic analysis of larval life-history traits in *Hyla crucifer*. *Evolution* 41:145-156.

Truhaut R. (1977). *Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives*. *Ecotoxicol Environ Saf* 1:151-173.

Úbeda C.A. (1999). Amenazas y declinación de anfibios andinos en Argentina. V° Congreso Latinoamericano de Herpetología 1999; p 114.

Ultsch G.R., Bradford D.F., Freda J. (1999). Physiology: Coping with the Environment. En: Tadpoles: the biology of anuran larvae. Eds: Mc Diarmid R.W. y Altig R. The University of Chicago Press. London. Cap: 8, 189-214 pp.

USEPA (1979). Interlaboratory comparisons of toxicity tests. US EPA Environ Res Lab Duluth Q Rep, pp.2-3.

USEPA (1989). Short-Term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Cincinnati: Environmental Protection Agency EPA/600/4-89/001. 59 p.

USEPA (1991). Technical Support Document for Water Quality-Based Toxic Control.; Washington, DC, EPA/440/4-85-032.

Venturino A., Gauna L.E., Bergoc R.M., Pechén de D'Angelo A.M. (1992). Effect of exogenously applied polyamines on malathion toxicity in the toad *Bufo arenarum* Hensel. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 22: 135-139.

Viglizzo E.F, Frank F.C., Carreño L. (2006). Situación ambiental en las ecorregiones pampa y campos y malezales. En: Brown, A., Martinez Ortiz U., Acerbi M., Corcuera J. (Eds.), La Situación Ambiental Argentina 2005, Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires, 2006.

Villar C., Tudino M., Bonetto C., De Cabo L., Stripeikis J., D'huicque L., Troccoli O. (1998). Heavy metal concentrations in the Lower Paraná River and right margin of the Río de la Plata Estuary. Verh. Internat. Verein. Limnol. 26:963-966.

Villar C., Stripeiskis J., Tudino M., D Huicque L., Troccoli O., Bonetto C. (1999). Trace metal concentrations in coastal marshes of the Lower Paraná River and the Río de la Plata Estuary. Hydrobiologia: 397:187-195.

Vouk V.B., Butler G.C., Hoel D.G., Peakall D.B. (1985). Methods for Estimating Risk of Chemical Injury: Human and Non-Human Biota and Ecosystems, SCOPE 26, John Wiley & Sons, New York.

Wake D.B. (1991). Declining amphibian populations. Science, 253:860

Wassersug R. (1971). On the comparative palatability of some dry-season tadpoles from Costa Rica. American Midl. Nat. 86:101-109.

Wassersug R.J., Hoff K. (1979). A comparative study of the buccal pumping mechanism of tadpoles. Biol. J. Linnean Soc. 12:225-259.

Westerman A.G. (1977). Lethal and teratogenic effects of inorganic mercury and cadmium on embryonic development of anurans. [M.S. thesis]. Lexington KY: University of Kentucky.

Wilbur H.M. (1972). Competition, predation, and structure of the *Ambystoma-Rana sylvatica* community. *Ecology* 53:3-21.

Wilbur H.M., Collins J.P. (1973). Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* 182: 1305-1314.

Wilbur, H.M. (1980). Complex life cycles. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 11:67-93.

Wilbur H.M. (1987). Regulation of structure in complex systems: Experimental temporary pond communities. *Ecology* 68: 1437-1452.

Zar J.H. (1999). *Biostatistical Analysis*; Prentice Hall: New Jersey; Chapters 17,18. 663 p.

Zhitkovich A., Voitkun V., Costa M. (1995). Glutathione and free amino acids form stable complexes with DNA following exposure of intact mammalian cells to chromate. *Carcinogenesis* 16:907-913.

Zhitkovich A., Song Y., Quievryn G., Voitkun V. (2001). Non-oxidative mechanism is responsible for the induction of mutagenesis by reduction of Cr (VI) with cysteine: the role of ternary DNA adducts in Cr(III)-dependent mutagenesis. *Biochemistry* 40:549-560.